



## Inclusion of natural antioxidant compounds in fish feeds to counteract oxidative stress

## Inclusión de compuestos antioxidantes naturales en dietas para peces para contrarrestar el estrés oxidativo

Armenta López, G.E.<sup>1\*</sup>, Sumaya Martínez, M.T.<sup>2</sup>, Spanopoulos Hernández, M.<sup>3</sup>, Balois Morales, R.<sup>1</sup>, Sánchez Herrera, M.<sup>1</sup>, Jiménez Ruíz, E.<sup>1</sup>.

Universidad Autónoma de Nayarit, <sup>1</sup>Unidad Académica de Agricultura, Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, km 9 Carretera Tepic-Compostela, C.P. 63780. Xalisco, Nayarit, México.

<sup>2</sup>Secretaría de Investigación y Posgrado, Unidad de Tecnología de Alimentos. Boulevard Tepic-Xalisco #325, C.P. 63155. Tepic, Nayarit, México.

<sup>3</sup>Instituto Tecnológico de Mazatlán, Laboratorio de Nutrición Acuicola. Calle Corsario 1 No. 203, Col. Urías, C.P. 82070. Mazatlán, Sinaloa, México.

### ABSTRACT

Oxidative stress is a type of damage caused by different kinds of pollutants such as xenobiotics, or by a deficiency in the body's own antioxidant mechanisms. It occurs because of a disturbance in the balance between the formation of free radicals and cellular antioxidants, often resulting in cell damage and physiological disorders. Among the most common and studied impacts are: lipid oxidation, protein, and nucleic acid damage. As a strategy to offset or minimize such damage, including sources of natural antioxidants in food to fishes has been opted, which unlike synthetic ones, these do not have side effects on the body. Amid the most used compounds are  $\alpha$ -tocopherol, ascorbic acid and phenolic compounds. Therefore, the results of research on the inclusion of these compounds in fish diets will be discussed in this paper.

### KEY WORDS

Antioxidants, oxidative damage, oxidative stress, free radicals.

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: November 27<sup>th</sup> 2013.

Accepted/Aceptado: August 14<sup>th</sup> 2014.

#### \*Corresponding Author:

Armenta López, G.E., Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, km 9 Carretera Tepic-Compostela, C.P. 63780. Xalisco, Nayarit, México. Phone: +52(311) 211 0127. E-mail: [geal\\_123@hotmail.com](mailto:geal_123@hotmail.com)

### RESUMEN

El estrés oxidativo es un daño causado por diversas clases de contaminantes como los xenobióticos, o por una deficiencia en los mecanismos antioxidantes del propio organismo. Se produce cuando se rompe el equilibrio entre la formación de radicales libres y los antioxidantes celulares, llegando a producir daño celular y trastornos fisiológicos. Dentro de los daños más comunes y estudiado se encuentran la oxidación de lípidos y proteínas, así como el daño en ácidos nucleicos. Como una estrategia para contrarrestar o minimizar estos daños se ha optado por incluir fuentes de antioxidantes naturales en los alimentos para peces, que a diferencia de los sintéticos no tienen efectos secundarios en el organismo. Dentro de los más utilizados se encuentran el  $\alpha$ -tocoferol, el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos. De acuerdo a lo anterior, en el presente trabajo se discutirán los resultados de investigaciones sobre la inclusión de estos compuestos en dietas para peces.

### PALABRAS CLAVE

Antioxidantes, daño oxidativo, estrés oxidativo, radicales libres.

## Introduction

Antioxidants are compounds that prevent molecules oxidation, inhibiting formation of free radicals or interrupting their propagation by means of some of the next mechanisms: 1) catching species that begin oxidation, 2) quelling metallic ions that are capable of generating reactive species, 3) stopping chain reaction of auto-oxidation and 4) reducing focalized oxygen concentration (Watanabe *et al.*, 2010). Oxidative stress is defined as the damage caused by the exposition of cells or tissues to an excess of oxidative substances, particularly free radicals, between which reactive oxygen species (ROS) are emphasized. Damage can be originated by the unbalance between pro-oxidant forces and antioxidants in favor of the first, by a defect in the enzymatic antioxidant mechanisms or both (Ding *et al.*, 2000). ROS include, mainly, superoxide radical ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radical (OH), which have a rather short life but of great reactivity, so they quickly combine with biomolecules such as DNA, proteins, lipids and glucids, producing changes in their structures and functioning (Friedberg *et al.*, 2006). Chronical oxidative stress stages accelerate in living beings the processes of aging and provoke neuronal damage associated to degenerative processes (Dumont and Beal, 2011). Tissues with higher metabolic activity are the ones that suffer major oxidative damage; in fishes these are gills, liver and kidney (Gallagher *et al.*, 1998; Tian *et al.*, 1998). Main damage associated with the attack of radicals are oxidation of lipid membranes (lipid peroxidation), proteins and nucleic acid oxidation (Dias, 1996; Kelly *et al.*, 1998). Lipid peroxidation (LPO) in fishes has been reported as a consequence of the contamination of the water bodies by xenobiotic or by the own redox cycles of enzymes of the organisms (Sayyed *et al.*, 2003) which directs to the loss of cellular function (Del Río *et al.*, 2005). It can also occur in lipids of the cellular membrane producing alteration in the cohesion, fluency, permeability and metabolic function, directing to cellular damage and dead (Del Río *et al.*, 2005, Zuman and Pardini, 1996). Lipid peroxidation comes from a reaction in chain which secondary products are capable of inactivate enzymes, react with proteins and even interact with DNA. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) are biomolecules that can suffer peroxidation and their susceptibility increases as the number of unsaturation does. LPO (Figure 1) initiates with the subtraction of a hydrogen atom from a methylo group ( $CH_3$ )

## Introducción

Los antioxidantes son compuestos que evitan la oxidación de moléculas, inhibiendo la formación de radicales libres ó interrumpiendo su propagación mediante alguno de los mecanismos siguientes: 1) atrapando las especies que inician la oxidación, 2) quelando iones metálicos capaces de generar especies reactivas, 3) frenando la reacción en cadena de la autooxidación, 4) reduciendo la concentración de oxígeno focalizada (Watanabe *et al.*, 2010). El estrés oxidativo se define como el daño causado por la exposición de células o tejidos a un exceso de sustancias oxidantes, particularmente radicales libres, entre los que destacan las sustancias reactivas al oxígeno (ERO's). El daño puede originarse por el desequilibrio entre fuerzas pro-oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, por un defecto en los mecanismos enzimáticos antioxidantes o por ambos (Ding *et al.*, 2000). Las ERO's incluyen, principalmente, al radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo (OH), los cuales tienen una vida muy corta pero de gran reactividad, por lo que se combinan rápidamente con biomoléculas como ADN, proteínas, lípidos y glúcidos, produciendo cambios en sus estructuras y funcionamiento (Friedberg *et al.*, 2006). En los seres vivos las etapas crónicas de estrés oxidativo aceleran los procesos de envejecimiento y provocan daño neuronal asociado a procesos degenerativos (Dumont y Beal, 2011). Los tejidos con mayor actividad metabólica son los que sufren mayor daño oxidativo; en los peces estos son branquias, hígado y riñón (Gallagher *et al.*, 1998; Tian *et al.*, 1998). Los principales daños asociados con el ataque de radicales son la oxidación de membranas lipídicas (peroxidación lipídica), oxidación de proteínas y oxidación de ácidos nucleicos (Dias, 1996; Kelly *et al.*, 1998). La peroxidación lipídica (LPO) en peces se ha reportado como una consecuencia de la contaminación de los cuerpos de agua por xenobióticos o bien por los propios ciclos redox de enzimas de los mismos organismos (Sayyed *et al.*, 2003) que conduce a la pérdida de función celular (Del Río *et al.*, 2005). Puede ocurrir en lípidos de la membrana celular produciendo alteración en la cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica, conduciendo al daño y muerte celular (Del Río *et al.*, 2005, Zuman y Pardini, 1996). La peroxidación lipídica proviene de una reacción en cadena cuyos productos secundarios son capaces de inactivar enzimas, reaccionar con proteínas e incluso interactuar con el ADN. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son biomoléculas que pueden sufrir peroxidación y su susceptibilidad aumenta a medida que se eleva el número de insaturaciones. La LPO (Figura 1) inicia con la sustracción de un átomo de hidrógeno de

of polyunsaturated lipid (LH), which generates a radical lipid (L•) (Zuman and Pardini, 1996), posteriorly a chain reaction occurs where the L• reacts with the oxygen generating peroxide and hydroperoxide radicals, and dienes conjugated (ROO•) (Di Giulio et al., 1995).

un grupo metilo (CH<sub>3</sub>) del lípido poliinsaturado (LH), lo que genera un radical lipídico (L•) (Zuman y Pardini, 1996), posteriormente ocurre una reacción en cadena donde el L• reacciona con el oxígeno generando radicales peróxido, hidroperóxidos y dienos conjugados (ROO•) (Di Giulio et al., 1995).

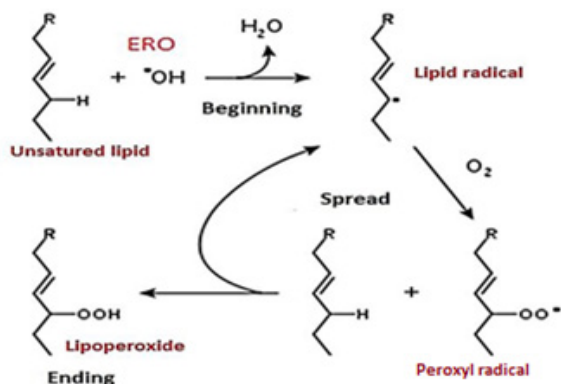


Figure 1. Lipid peroxidation mechanism

Figura 1. Mecanismo de la peroxidación lipídica

In a third phase, compounds previously formed are decomposed giving rise to malondialdehyde and the 4-hydroxynonenal (Zuman and Pardini, 1996). Protein oxidation occurs in the lateral chains of amino acids, particularly with thiol groups, which are transformed to disulphides (Figure 2), sulphenic acid or aromatic amino acids, which conducts to the alteration in its structure and function in the hydrogen bonds of the secondary structure of proteins (Reed, 1995). Radical -OH can remove protons from methylene groups of amino acids, giving rise to formation of carbonyls that tend to link amines of the proteins or joint covalently to DNA causing a crosslinking.

En una tercera fase se descomponen los compuestos formados anteriormente dando lugar al malondialdehído y el 4-hidroxinonenal (Zuman y Pardini, 1996). La oxidación de proteínas ocurre en las cadenas laterales de los aminoácidos particularmente con grupos tiol, que son transformados a disulfuros (Figura 2), ácido sulfenilico o aminoácidos aromáticos, lo que conduce a la alteración en su estructura y función como en los puentes de hidrógeno de la estructura secundaria de las proteínas (Reed, 1995). El radical -OH puede remover protones de los grupos metileno de los aminoácidos, dando lugar a la formación de carbonilos que tienden a ligar aminas de las proteínas o unirse covalentemente al ADN causando un entrecruzamiento.

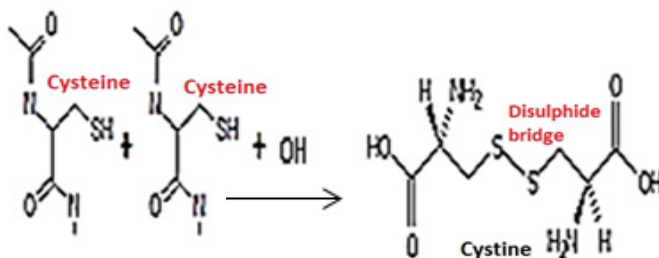
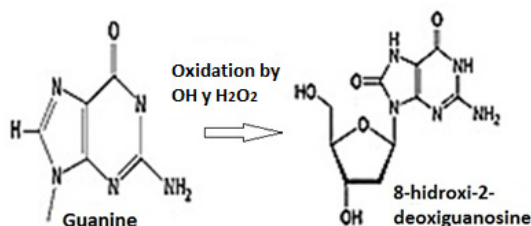


Figure 2. Mechanism of oxidation in amino acid cysteine

Figura 2. Mecanismo de la oxidación en aminoácido cisteína

Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and oxidrilo (-OH) are the main implicated agents on DNA damage (Reed, 1995). The most important DNA modification is the hydroxylation of the nitrogenous base guanine with the production of 8-hidroxi-2-deoxiguanosine (Figure 3), apart from provoking alterations in the genetic material, mutations, chromatid breakage, crosslinking, as well as loss of fragments of chromosomes (Reed, 1995; Van der Oost *et al.*, 2003).

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el oxidrilo (-OH) son los principales agentes implicados en el daño sobre el ADN (Reed, 1995). La modificación del ADN más importante es la hidroxilación de la base nitrogenada guanina con la producción de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (Figura 3), además de provocar alteraciones en el material genético, mutaciones, rotura de cromátidas, entrecruzamientos, así como pérdida de fragmentos de cromosomas (Reed, 1995; Van der Oost *et al.*, 2003).



**Figure 3. Oxidation of nucleic acids (guanine) by ERO's**

**Figura 3. Oxidación de ácidos nucleicos (guanina) por ERO's**

From the past years, the use of natural antioxidants has been given great relevance in aquaculture, using them directly in the elaboration of feed or applying to tank water. Therefore, the objective of this paper was to perform a revision on researches about the inclusion of natural antioxidants in aquaculture feed and their impact in the reduction or elimination of oxidative stress.

#### Use of antioxidants and their origin

There are antioxidants of synthetic type used for the preservation of food for both human and animal consumption; for example: butylhydroxyanisol, butylhydroxytoluene and propyl gallate (PG) (Moure *et al.*, 2001). Currently, synthetic antioxidants are restricted in various countries, since it has been proven that they cause harmful effects in that who consumes them. Therefore, the use of vegetal antioxidants has increased, because being natural they are considered to be safer for the consumer. A great number of herbs and spices contain compounds that can be removed and added to alimentary systems to prevent their oxidation (Lee and Shibamoto, 2002; Ahn *et al.*, 2007; Rojas and Brewer, 2008; Sasse *et al.*, 2009). Muchuweti *et al.*, (2007) determined that oregano (*Origanum vulgare*) has an antioxidant activity of 58 %, overtaken only by cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) with a 61.8 %. On the other

Desde hace algunos años el uso de antioxidantes naturales ha tomado gran relevancia en la acuicultura, utilizándolos directamente en la elaboración de alimentos o aplicándolos en el agua del estanque. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión de investigaciones sobre la inclusión antioxidantes naturales en alimentos acuícolas y su impacto en la reducción o eliminación del estrés oxidativo.

#### Utilización de antioxidantes y su origen

Existen antioxidantes de tipo sintético utilizados para la preservación de alimentos tanto para consumo humano como animal, por ejemplo, butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno y el propil galato (PG) (Moure *et al.*, 2001). En la actualidad, los antioxidantes sintéticos están restringidos en varios países, ya que se ha demostrado que causan efectos nocivos en quien los consume. Por tal razón, ha aumentado el uso de los antioxidantes de origen vegetal, que por ser naturales se consideran más seguros para el consumidor. Un gran número de especias y hierbas contienen compuestos que pueden ser removidos y añadidos a sistemas alimentarios para prevenir la oxidación de éstos (Lee y Shibamoto, 2002; Ahn *et al.*, 2007; Rojas y Brewer, 2008; Sasse *et al.*, 2009). Muchuweti *et al.*, (2007) determinaron que el orégano (*Origanum vulgare*) tiene una actividad antioxidante del 58 %, superado solo por la canela (*Cin-*

hand, basil (*Ocimum basilicum*) possesses a great capacity to avoid LPO due to its high content of compounds such as rosmarinic acid, linalool and bergamotene (Lee y Scagel, 2009; Hussain et al., 2008). Garlic (*Allium sativum*) and shallots (*Allium ascalonicum*) show a great capacity of catching free radicals since they contain flavonoids and sulphur compounds (Amagase, 2006). Grapes (*Vitis vinifera*) have a high content of flavonoids, phenolic acids and stilbenoids, which makes them an excellent natural source of antioxidant. Radovanovic et al., (2009) and Iacopini et al., (2008) report that grapes have a great antioxidant activity between 66.4 and 81.4 %. Vitamins C, E and A, as well as carotenoids and phenolic compounds are some of the major interest antioxidants (Rizner et al., 2009; Avello and Suwalsky, 2006). Diverse researches have reached the conclusion that  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) allows to maintain the lipid stability in fish filets, and much better than other forms of tocopherols, rosmarinic acid and the synthetic antioxidants themselves (Avello and Swalsky, 2006; Amin et al., 2012; Pinho et al., 2005; Gao et al., 2012). Estevez and Heinonen (2010) report that  $\alpha$ -tocopherol can inhibit protein oxidation, since the results of their researches show that it decreased the formation of semialdehyde  $\alpha$ -glutamic and  $\alpha$ -aminoadipic significantly (products of protein oxidation). Willis et al., (2007) affirm that by adding  $\gamma$ -tocopherol, by using a polar carrier, it can be incorporated to the phospholipid cellular fraction, protecting it from the attack of free radicals. Yeum et al., (2009) reported synergic effects between the ascorbic acid and the  $\alpha$ -tocopherol, as well as a bioaccumulation in the phospholipid cellular membrane. Likewise, by adding  $\alpha$ -tocopherol to food for animal consumption, evidence shows that there are significant effect on the antioxidant activities of tissues and it grants lipid stability to food derived from them (Formanek et al., 2001; Swigert et al., 2004; Guo et al., 2006; Boler et al., 2009; Lahucky et al., 2010). A great amount of researches has been developed to verify application and effectiveness of compounds such as polyphenolic compounds, rosmarinic acid, quercetin, flavonoids and others, as antioxidant agents in food (Landines and Zambrano, 2009).

#### **Inclusion of natural antioxidants in fish feed**

Amin and Hashem (2012) evaluated the effect of inclusion of  $\alpha$ -tocopherol in the diets on the oxidative stress in catfish (*Clarias gariepinus*) caused by deltamethrin, finding that by supplementing vitamin to fis-

*namomum zeylanicum*) con un 61.8 %. Por otra parte, la albahaca (*Ocimum basilicum*) posee una gran capacidad para evitar la LPO debido a su alto contenido de compuestos como el ácido rosmarínico, el linalol y el bergamoteno (Lee y Scagel, 2009; Hussain et al., 2008). El ajo (*Allium sativum*) y los echalotes (*Allium ascalonicum*) muestran una elevada capacidad de atrapar radicales libres, ya que contienen flavonoides y compuestos azufrados (Amagase, 2006). Las uvas (*Vitis vinifera*) tienen un alto contenido de flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenoides, lo que las hace una excelente fuente natural de antioxidantes. Radovanovic et al., (2009) y Iacopini et al., (2008) reportan que las uvas tienen una actividad antioxidante entre el 66.4 % y 81.4 %. Las vitaminas C, E y A, así como los carotenoides y los compuestos fenólicos son algunos de los antioxidantes de mayor interés (Rizner et al., 2009; Avello y Suwalsky, 2006). Diversas investigaciones han llegado a la conclusión de que el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) permite mantener la estabilidad lipídica en filetes de pescado, mejor aún que otras formas de tocoferoles, ácido rosmarínico y que los mismos antioxidantes sintéticos (Avello y Swalsky, 2006; Amin et al., 2012; Pinho et al., 2005; Gao et al., 2012). Estévez y Heinonen (2010) reportan que el  $\alpha$ -tocoferol puede inhibir la oxidación de proteínas, ya que los resultados de sus investigaciones mostraron que éste disminuyó significativamente la formación de semialdehído  $\alpha$ -glutámico y de  $\alpha$ -aminoadipil (productos de oxidación de proteínas). Willis et al., (2007) afirman que al adicionar  $\gamma$ -tocoferol, usando un acarreador polar, éste puede ser incorporado a la fracción fosfolipídica celular, protegiéndola del ataque de radicales libres. Yeum et al., (2009) reportaron efectos sinérgicos entre el ácido ascórbico y el  $\alpha$ -tocoferol, así como una bioacumulación en la membrana fosfolipídica celular. Así mismo, al adicionar  $\alpha$ -tocoferol a los alimentos para consumo animal, la evidencia muestra que hay efectos significativos sobre las actividades antioxidantes de los tejidos y que confiere estabilidad lipídica a los alimentos derivados de éstos (Formanek et al., 2001; Swigert et al., 2004; Guo et al., 2006; Boler et al., 2009; Lahucky et al., 2010). Se han desarrollado una gran cantidad de investigaciones para verificar la aplicación y efectividad de compuestos tales como los compuestos polifenólicos, el ácido rosmarínico, la quercetina, los flavonoides y otros más, como agentes antioxidantes en alimentos (Landines y Zambrano, 2009).

#### **Inclusión de antioxidantes naturales en dietas para peces**

Amin y Hashem (2012) evaluaron el efecto de la inclusión de  $\alpha$ -tocoferol en las dietas sobre el estrés oxidativo en bagre (*Clarias gariepinus*) causado por deltamethrin.

hes after exposing them to deltamethrin, MDA levels and catalase activity they go back to their original basal state. Likewise, Welker and Congleton (2009) evaluated the effect of  $\alpha$ -tocopherol combined with ascorbic acid (AA), iron and selenium on the oxidative stress of salmon (*Oncorhynchus tshawytscha walbaum*). The results show that tocopherols and AA diminish oxidative stress and that the minimum required of both is of 50 mg kg<sup>-1</sup> of feed, even though a supplementation of 350 mg kg<sup>-1</sup> grant a major protection against induction of LPO. Pan *et al.*, (2011) evaluated the antioxidant response in fish *Hypessobrycon eques* fed with feed added with  $\beta$ -carotene, astaxanthin and a mix of them. Results show that supplementation of astaxanthins and  $\beta$ -carotenes diminish the stress provoked by ammonium, concluding that 10mg of  $\beta$ -carotene or astaxanthins per kilogram of feed are enough. Nakano *et al.*, (1999) analyzed the impact on the supplementation of red yeast (*Phaffia rhodozyma*), rich in this compound, on the oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). They evaluated the levels of malonic aldehyde (MDA) in muscle, concluding that the levels of LPO are maintained in basal levels this organisms. In this sense, Huei *et al.*, (2004) researched the effect of diet administration of vitamin E on the LPO in muscle and liver of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*), feeding these fishes with food which oils were oxidated and tried five levels of inclusion of  $\alpha$ -tocopherol (40 IU the minor and 300 IU kg<sup>-1</sup> the major). They concluded that 64 IU kg<sup>-1</sup> of vitamin E are enough to maintain the levels of LPO close to basal state in the analyzed tissues. Gao *et al.*, (2012) also evaluated the impact of supplementation of vitamin E on the level of LPO (in liver and muscle) and growth in Japanese snapper (*Pagrus major*). In this study organisms were fed with food elaborated with oxidated oils and their results showed that the level of LPO is major in organisms fed with feed in such state, but without supplementing vitamin. They concluded that supplemented fishes with  $\alpha$ -tocopherol grow healthier and that the increase in the inclusion of this antioxidant reduced the LPO. Pinho *et al.*, (2005) evaluated the antioxidant response in crab exposed to microcystins, pre-treated with feed added with vitamin E. They also evaluated the catalase activity (CAT) in gill, resulting major in crabs pre-treated with vitamin E, which indicates that this tissue needs major concentration of antioxidants. They observed that the administration of vitamin E increases the concentration of antioxidants in this tissue, which carries the diminishment in the CAT, activity. Prieto *et al.*, (2008)

trina, encontrando que al suplementar la vitamina a los peces, después de exponerlos a la deltametrina, los niveles del MDA y las actividades de catalasa regresan a su estado basal. Así mismo, Welker y Congleton (2009) evaluaron el efecto de  $\alpha$ -tocoferol combinado con ácido ascórbico (AA), hierro y selenio sobre el estrés oxidativo en salmón (*Oncorhynchus tshawytscha walbaum*). Los resultados muestran que los tocoferoles y el AA disminuyen el estrés oxidativo y que el mínimo requerido de ambos es de 50 mg kg<sup>-1</sup> de alimento, aunque una suplementación de 350 mg kg<sup>-1</sup> otorga una mayor protección contra la inducción de LPO. Pan *et al.*, (2011) evaluaron la respuesta antioxidante en pez gota de sangre (*Hypessobrycon eques*) alimentados con piensos adicionados con  $\beta$ -caroteno, astaxantinas y mezcla de ellos. Los resultados muestran que la suplementación de astaxantinas y  $\beta$ -carotenos disminuyen el estrés provocado por amonio, concluyendo que 10 mg de  $\beta$ -caroteno o astaxantinas por kilogramo de alimento son suficientes. Nakano *et al.*, (1999) analizaron el impacto de la suplementación de levadura roja (*Phaffia rhodozyma*) rica en este compuesto, sobre el estrés oxidativo en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Evaluaron los niveles de aldehído malónico (MDA) en músculo, concluyendo que se mantienen al mínimo los niveles de LPO en estos organismos. En este sentido, Huei *et al.*, (2004) investigaron el efecto de la administración dietaria de vitamina E sobre la LPO en músculo e hígado de tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*), alimentando a estos peces con piensos cuyos aceites estaban oxidados y probaron cinco niveles de inclusión de  $\alpha$ -tocoferol (40 IU el menor y 300 IU kg<sup>-1</sup> el mayor). Estos investigadores concluyeron que 64 IU kg<sup>-1</sup> de vitamina E son suficientes para mantener los niveles de LPO cercanos al estado basal en los dos tejidos analizados. Gao *et al.*, (2012) también evaluaron el impacto de la suplementación de vitamina E sobre el nivel de LPO (en hígado y músculo) y crecimiento en pargo japonés (*Pagrus major*). En este estudio alimentaron los organismos con piensos elaborados con aceites oxidados y sus resultados mostraron que el nivel de LPO es mayor en organismos alimentados con piensos en este estado, pero sin suplementar la vitamina. Estos autores concluyeron que los peces suplementados con  $\alpha$ -tocoferol crecen de forma más saludable y que el incremento en la inclusión de este antioxidante redujo la LPO. Pinho *et al.*, (2005) evaluaron la respuesta antioxidante en cangrejos expuestos a microcistinas, pre-tratados con alimentos adicionados con vitamina E. Evaluaron la actividad de la catalasa (CAT) en las branquias, resultando mayor en los cangrejos pre-tratados con vitamina E, lo que indica que este tejido necesita mayor concentración de antioxidantes. Ellos observaron que la administración de vitamina E aumenta la concentración de antioxidantes en este tejido, lo que conlleva

researched the time in which the trolox is effective against oxidative damage after the exposition to microcystins (MC) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The obtained results show that LPO was significantly minor (in gills, liver and kidney) in the organisms treated with trolox, with similar values to those of the control group. Regarding enzymatic activities CAT, Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), they denote that such tissues are highly susceptible to intoxication for MC, but that in organisms pre-treated with antioxidants they go back to their basal states in the 24 hours after the administration of MC. Mohebbi et al., (2012) supplemented garlic in feed for rainbow trout and evaluated the impact on the level of LPO and the enzymatic activity of CAT, SOD and GPx. Results show a diminishment in the values of LPO after the treatment. About the activity of SOD, there was a significant increase in the treatments with garlic, CAT activity reduced significantly, while the GPx activity had no significant changes. Kumar et al., (2009) researched the effect of food supplementation of AA, garlic and taurine on the stress of catfish (*Ameiurus catus*). The results of major activity of CAT and SOD and the diminishment on the level of LPO assure that supplementation of these antioxidants decreases the oxidative stress. On the other hand, Girao et al., (2012) included lycopene in the feed for Nile tilapia in order to evaluate its impact on the level of cortisol and the antioxidant response when being exposed to stress by overcrowding. The results show that the administration of lycopene diminishes the level of cortisol and keeps the enzymatic activities in their normal states. Yonar (2012) analyzed the impact of including lycopene in the feed of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stressed with oxytetracycline (OTC). In this research, the antioxidant was administered directly to the organism, not through food. The results derived of this research show that the pre- and post-treatment with lycopene mitigated the oxidative stress, diminishing significantly the levels of LPO and increasing the activities of CAT, SOD and GPx in the analyzed tissues (liver, kidney and blood). Dantagnan et al., (2013) evaluated the interaction of selenium and vitamin E included in diets for juveniles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and analyzed the effects on oxidative stress. These authors found that concentration of selenium, immunity indicators and enzyme activity of the oxidative stress increased significantly. Paves et al., (2013) worked with inclusion of arachidonic

a la disminución en la actividad de la CAT. Prieto et al., (2008) investigaron el tiempo en el cual el trolox es efectivo contra el daño oxidativo después de la exposición a microcistinas (MC) en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Los resultados obtenidos muestran que la LPO fue significativamente menor (en branquias, hígado y riñón) en los organismos tratados con trolox, con valores similares a los del grupo control. En cuanto a las actividades enzimáticas CAT, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), éstos denotan que dichos tejidos son altamente susceptibles a la intoxicación por MC, pero que en organismos pre-tratados con antioxidantes regresan a sus estados basales a las 24 horas después de la administración de MC. Mohebbi et al., (2012) suplementaron ajo en alimentos para trucha arcoiris y evaluaron el impacto sobre el nivel de LPO y la actividad enzimática de CAT, SOD y GPx. Los resultados muestran una disminución de los valores de LPO después del tratamiento. En cuanto a la actividad de SOD, hubo un aumento significativo en los tratamientos con ajo, la actividad de CAT se redujo significativamente, mientras que la actividad de la GPx no tuvo cambios significativos. Kumar et al., (2009) investigaron el efecto de la suplementación alimenticia de AA, ajo y taurina, sobre el estrés en bagre (*Ameiurus catus*). Sus resultados de mayor actividad de CAT y SOD y la disminución del nivel de LPO aseguran que la suplementación de estos antioxidantes disminuye el estrés oxidativo. Por otra parte, Girao et al., (2012) incluyeron licopeno en el alimento para tilapia nilótica para evaluar su impacto sobre el nivel de cortisol y la respuesta antioxidante al ser expuestas a estrés por hacinamiento. Sus resultados muestran que la administración de licopeno disminuye el nivel de cortisol y mantiene las actividades enzimáticas en sus estados normales. Yonar (2012), analizó el impacto de incluir licopeno en la alimentación de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) estresadas con oxitetraciclina (OTC). En esta investigación el antioxidante se administró de manera directa al organismo, no a través del alimento. Los resultados derivados de esta investigación muestran que el pre- y post-tratamiento con licopeno atenuó el estrés oxidativo, disminuyendo significativamente los niveles de LPO y aumentando las actividades de CAT, SOD y GPx en los tejidos analizados (hígado, riñón y sangre). Dantagnan et al., (2013) evaluaron la interacción de selenio y vitamina E incluida en dietas para juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y analizaron los efectos sobre el estrés oxidativo. Estos autores encontraron que la concentración de selenio, los indicadores de inmunidad y la actividad de las enzimas del estrés oxidativo aumentaron significativamente. Paves et al., (2013) trabajaron con inclusión de ácido araquidónico (ARA) y antioxidantes naturales en la dieta para alevines de salmón del Atlántico

acid (ARA) and natural antioxidants in the diet for Atlantic salmon fry (*Salmo salar*) and evaluated the oxidative stress and accumulation of ARA in liver. They found that both antioxidants increase the expression of enzymes SOD, GPx and CAT, the latter being the one that had the major expression. Carrasco *et al.*, (2013) evaluated the antioxidant and immunostimulant response of salmon (*Salmo salar*) fed with functional diets added with antioxidants. The results obtained showed

(*Salmo salar*) y evaluaron el estrés oxidativo y la acumulación del ARA en el hígado. Encontraron que los dos antioxidantes aumentan la expresión de las enzimas SOD, GPx y CAT, siendo esta última la que tuvo mayor expresión. Carrasco *et al.*, (2013) evaluaron la respuesta antioxidante e inmunostimulante de salmón (*Salmo salar*) alimentado con dietas funcionales adicionadas con antioxidantes. Ellos obtuvieron que las dietas suplementadas con

**Table 1.**  
**Researches on the impact of natural antioxidants on oxidative stress in fishes.**

**Tabla 1.**  
**Investigaciones sobre el impacto de antioxidantes naturales sobre el estrés oxidativo en peces.**

Authors/year	Research species	Stress catalyst	Antioxidant used	Results
Nakano <i>et al.</i> , 1999	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Diet with oxidized oil	Red yeast rich in astaxanthin	MDA levels were maintained in basal levels
Huei <i>et al.</i> , 2004	Híbrido tilapia ( <i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i> )	Diet with oxidized oil	Vitamin E	64 IU of vitamin per kg of food was enough to keep the LPO levels near to basal ones
Pinho <i>et al.</i> , 2005	Crab ( <i>Chasmagnathus granulatus</i> )	Microcystins	Vitamin E	Pre-treatment with vitamin E keeps CAT activity at its basal levels
Prieto <i>et al.</i> , 2008	Nile Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Microcystins	Trolox	Pre-treated organisms showed LPO level and CAT, SOD, GPx and GR activities similar to those of control group
Yonar <i>et al.</i> , 2012	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Oxytetracycline	Lycopene	Previous and posterior lycopene supplementation to stress attenuated the parameters of oxidative stress
Dantagnan <i>et al.</i> , 2013	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	-----	Vitamin E selenium	Oxidative stress parameters diminished significantly
Paves <i>et al.</i> , 2013	Atlantic salmon ( <i>Salmo solar</i> )	-----	Arachidonic acid	There was an increase in the expression of the enzymes of SOD, CAT and GPx

that supplementary diets with antioxidants have the capacity of protecting the fish in front of oxidation of biomolecules. The results of the most relevant researches are shown in Table 1.

antioxidantes tiene la capacidad de proteger al pez frente a la oxidación de biomoléculas. Los resultados de las investigaciones más relevantes se muestran en la Tabla 1.

## Conclusions

The inclusion of natural antioxidants in feed has a positive impact on the growth and mitigation of oxidative stress. Antioxidants used range from some vitamins (A, C and E), compounds extracted from plants,

## Conclusiones

La inclusión de antioxidantes naturales en los alimentos tiene un impacto positivo sobre el crecimiento y en la mitigación del estrés oxidativo. Los antioxidantes utilizados van desde algunas vitaminas (A, C y E), compues-



such as lycopene of tomatoes, inulin, garlic extracts and some microorganisms such as yeast rich in astaxanthins. It is important to continue with the research on the impact of these and other antioxidants in order to allow, in a short future, its application in animal diets and put aside those from synthetic origin, apart from researching if there is bioaccumulation of these compounds in the organism, in tissues such as muscle, liver and skin.

tos extraídos de plantas, como el licopeno de los tomates, la inulina, extractos de ajo y algunos microorganismos como la levadura rica en astaxantinas. Es importante continuar con la investigación sobre el impacto de estos y otros antioxidantes para propiciar en un futuro su aplicación en dietas animales y dejar de lado los que son de origen sintético, además de investigar si existe una bioacumulación de estos compuestos en el organismo, en tejidos como músculo, hígado y piel.

## References

- Amagase, H. 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *Journal of Nutrition* 136: 716S-725S.
- Amin, K. and Hashem K. 2012. Deltametrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *Veterinarian Research* 8: 45-53.
- Avello, M. and Suwalsky M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concept.)* 494: 161-172.
- Boler, D., Gabriel, S., Yang, H., Balsbaugh, R., Mahan, D., Brewer M., et al. 2009. Effect of different dietary levels of natural-source vitamin E in grow-fish pigs on pork quality and self life. *Meat Scientific* 83: 723-730.
- Carrasco, M., Reyes-Cerpa, S. and Sandino, A. 2013. Evaluación antioxidante e inmunoestimulante de dietas funcionales para salmón sometido a condiciones de hacinamiento. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Acuicultura de Chile.
- Dantagnan, P., Hernández, A., González, K., Rodríguez, U. and Bórques A. 2013. Interacción Se/vitamina E en dietas para juveniles de trucha arcoíris: efectos sobre el estrés oxidativo. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Acuicultura de Chile.
- Del Rio, D., Stewart, A. and Pellegrini, N. 2005. A review of recent studies on malonaldehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 15: 316-328.
- Días, B. 1996. Oxidative stress as biomarkers of polluted aquatic sites. *Physiology and Biochemistry of Fishes of the Amazon* 331-340.
- Ding, W., Shen, M. and Ong, C. 2000. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environmental Health Perspectives* 108: 605-609.
- Dumont, M. and Beal, M. 2011. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* 51: 1014-1026.
- Estevez, M. and Heinonen, M. 2010. Effect of phenolic compounds on the formation of alpha-amino adipic and gamma-glutamic semialdehydes from myofibrillar protein oxidized by copper, iron and myoglobin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58 (7): 4448-4455.
- Formanek, Z., Kerry, J., Higgins, F., Buckley, D., Morrissey, P. and Farkas, J. 2001. Addition of synthetic and natural antioxidants to alpha-tocopherol acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat Scientific* 58: 337-341.
- Friedberg, E., Walker, G. and Siede, W. 2006. DNA repair and mutagenesis.
- Friedberg, E., Walker, G., Sied, W., Wood, R., Schultz, R. and Ellerberger, T. 2006. (Ed.) ASM Press, Washington D.C., 1118 pp.
- Gallagher, D., Belmonte, D., Deurenberd, P., Eang, Z., Krasnow, N., Pi-Sunyer, F., et al. 1998. Organ-tissue mass measurement allows modelling of REE and metabolically active tissue mass. *Physiology Endocrinology Metabolism* 275: E-249-E-259.
- Gao, J., Koshio, S., Ishiwaka, M., Yokoyama, S. and Mamauag, E. 2012. Effects of dietary oxidized fish oil with vitamin E supplementation on growth performance and reduction of lipid peroxidation in tissues and blood of red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 356: 73-79.
- Girao, P., Pereira, E. and De Melo, M. 2012. Dietary lycopene supplementation on Nile Tilapia juveniles submitted to confinement: effects on cortisol level and antioxidant response. *Aquaculture Research* 43: 789-798.

- Guo, Q., Richert, J., Carr, T., Brewer, M. and Culbertson M. 2006. Effects of dietary vitamin E and fats supplementation on pork quality. *Journal Animal Scientific* 84: 3089-99.
- Hamre, K., Kolas, K. and Sandres, K. 2009. Protection of fish feed, made directly from marine raw materials with natural antioxidants. *Food Chemistry* 119: 170-178.
- Huei, C. and Huang, S. 2004. Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *O. niloticus* x *O. aureus*, fed oxidized oil. *Aquaculture* 237: 381-389.
- Hussain, I., Anwara, F., Sheraz, S. and Przybylski, R. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on season variations. *Food Chemistry* 108: 986-998.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grapes: content, *in vitro* antioxidant activity and interaction. *Journal of Food Composition Analysis* 2008; 21: 589-598
- Kelly, S., Havvilla, C., Brady, T. and Abramo, K. 1998. Oxidative stress in toxicology; established mammalian and emerging piscine model systems environmental health perspectives. Levin Ed. 106 pp.
- Kumar, P., Prasad, Y., Patra, A., Ranjan, R., Swarup, D., Patra, R., et al. 2009. Ascorbic acid, garlic extract and taurine alleviate cadmium-induced oxidative stress in freshwater catfish. *Science of the Total Environment* 407: 5024-30.
- Lahucky, R., Nuernberg, K., Kovac, L., Bucko, O. and Nuernberg, G. 2010. Assessment of the antioxidant potential of selected plant extracts in vitro and in vivo experiments on pork. *Meat Scientific* 85: 779-784.
- Landines, M. and Zambrano, J. 2009. La oxidación lipídica en la cadena de producción acuícola. *Revista de Investigación Agrícola y Ambiental* 13-22.
- Lee, K. and Shibamoto, T. 2002. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal Agriculture Food Chemistry* 50: 4947-4952.
- Lee, J. and Scagel, C. 2009. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basicicum*) leaves. *Food Chemistry* 115: 650-656.
- Mohebbi, A., Nematollahi, A., Dorcheh, E. and Asad, F. 2012. Influence of dietary garlic on the antioxidative status of rainbow trout. *Aquaculture Research* 43: 1184-1193.
- Moure, A., Cruz, J., Franc, D., Domínguez, M., Sineiro, J., Domínguez H, et al. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72: 145-171.
- Muchuweti, M., Kativu, E., Mupure, C., Chidewe, C., Ndhala, A. and Benhura M. 2007. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *Journal of Food Technology* 2: 414-420.
- Nakano, T., Kanmuri, T., Sato, M. and Takouchi, M. 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast on oxidative stress in rainbow trout. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426: 119-125
- Pan C., Chien Y., Wang Y. 2011. Antioxidant defense to ammonia stress of characins (*Hyphessobrycon eques steindachner*) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquaculture Nutrition* 17: 258-266.
- Paves, C., Hernández, A., Rodríguez, U., Vidal, R.A. and Dantagnan, P. 2013. Inclusión de ácido araquidónico y antioxidantes naturales en la dieta para alevines de salmon (*S. solar*) sometidos a estrés: evaluación de estrés oxidativo y acumulación de ARA en el hígado. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Acuicultura de Chile.
- Pinho, G., Da Rosa, A., Maciel, F., Bianchin, A., Yunes, J., Proenca, L., et al. 2005. Antioxidant responses after microcystin exposure in gills of an estuarine crab species pre-treated with vitamin E. *Ecology and Environmental Safety* 61: 361-365.
- Prieto, A., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I., Álvarez, M., Moyano, R., et al. 2008. Time- Depend protective efficacy of trolox (vitamin E analog) against microcystin-induced toxicity in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology* 28: 563-579.
- Radovanovic, A., Radovanovic, B. and Jovancevic, B. 2009. Free radical scavenging and bacterial of southern serbian red wines. *Food Chemistry* 117: 326-331.
- Rizner, A., Hadolin, M., Knez, Z. and Bouman, D. 2009. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with alpha-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry* 71: 229-233.
- Reed, D. 1995. Toxicity of oxygen. Molecular and cellular mechanism of toxicity. Ed. Francesco De Matters, Lewis L Smith. CRC Press. Whashintong D.C. 35 pp.
- Rojas, M. and Brewer, M. 2008. Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork. *Journal Food Quality* 3: 173-188.
- Sasse, A. and Colindres P. 2009. Brewer M. Effect of natural and synthetic antioxidants on oxidative stability of cooked, frozen pork patties. *Journal Food Scientific* 74: 530-535.

- Sayed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafee, Z., Haque, R. and Raisuddin, S. 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin fresh-water fish. *Ecotoxicology Environmental Safety* 56: 295-301.
- Swigerts, K., McKeith, F., Carr, T., Brewer, M. and Culbertson, M. 2007. Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub>, vitamin E and magnesium supplementation on pork quality. *Meat Scientific* 67: 81-86.
- Tian, L., Caib, Q. and Wei, H. 1998. Alterations of antioxidants enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radical Biology and Medicine* 24: 1477-1484.
- Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. *Asses Environmental Toxicology and Farmacy* 13: 149-157.
- Watanabe, Y., Nakanashi, H., Goto, N., Otsuka, K., Kimura, T. and Adochi, S. 2010. Antioxidative properties of ascorbic acid and acyl ascorbates in ML/W emulsion. *Journal American Oil Chemistry Society* 85: 1475-1480.
- Welker, T., Congleton. 2009. Effect of dietary alpha-tocopherol + ascorbic acid, selenium and iron on oxidative stress in sub-yearling Chinook salmon. *Journal of Physiology and Nutrition* 93: 15-25.
- Willis, T. and Heinonen, M. 2007. Improved antioxidant activity of Vitamin E through solubilization in ethanol: A model study with ground beef. *Meat Scientific* 76: 305-312.
- Yeum, K., Beretta, G., Krisky, N., Russel, R. and Aldini, G. 2009. Synergistic interactions of antioxidant nutrients in a biological model system. *Nutrition* 25: 839-846.
- Yonar, M. 2012. The effect of lycopene on oxytetracycline-induced oxidative stress and immunosuppression in rainbow trout. *Fish and Immunology* 32: 994-1001.
- Zuman, K. and Pardini, R. 1996. An overview of the relationship between oxidative stress and mercury and arsenic. *Toxic Substance Mechanism* 15: 151-1.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Armenta López, G.E., Sumaya Martínez, M.T., Spanopoulos Hernández, M., Balois Morales, R., Sánchez Herrera, M., Jiménez Ruiz, E. (2015). Inclusion of natural antioxidant compounds in fish feeds to counteract oxidative stress. *Revista Bio Ciencias* 3(2): 68-78. <http://editorial.uan.edu.mx/BIOCIENCIAS/article/view/168/146>

