



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (PPGCTAL)

KARINA LEITE

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EXTRATO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*)
COMO ANTIOXIDANTE EM CAMARÕES (*Macrobrachium rosenbergii*) E
EFEITOS SOBRE A COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA CARNE**

LARANJEIRAS DO SUL – PARANÁ – BRASIL

2019

KARINA LEITE

**AVALIAÇÃO IN VIVO DO EXTRATO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*)
COMO ANTIOXIDANTE EM CAMARÕES (*Macrobrachium rosenbergii*) E
EFEITOS SOBRE A COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA CARNE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus de Laranjeiras do Sul, como parte das exigências para obtenção do título Mestre.

Orientadora: Dra. Luisa Helena Cazarolli

Coorientadora: Dra. Silvia Romão

LARANJEIRAS DO SUL – PARANÁ – BRASIL

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Campus Laranjeiras do Sul-PR

Rodovia BR 158 - Km 405

CEP 85301-970

Telefone: (42) 3635-0000

Laranjeiras do Sul - PR

Brasil

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Leite, Karina

AVALIAÇÃO IN VIVO DO EXTRATO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*) COMO ANTIOXIDANTE EM CAMARÕES (*Macrobrachium rosenbergii*) E EFEITOS SOBRE A COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA CARNE /
Karina Leite. -- 2019.

64 f.

Orientador: Luisa Helena Cazarolli.

Co-orientador: Silvia Romão.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos-PPGCTAL, Laranjeiras do Sul, PR, 2019.

1. Extrato de alecrim. 2. Camarão de água doce. 3.
Antioxidantes. 4. Metabolismo. I. Cazarolli, Luisa Helena, orient. II. Romão, Silvia,
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

KARINA LEITE

AVALIAÇÃO *in vivo* DO EXTRATO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*) COMO ANTIOXIDANTE EM CAMARÕES *Macrobrachium rosenbergii* E EFEITOS SOBRE A COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA CARNE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

26 / 06 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.ª Dra. Luisa Helena Cazarolli – UFFS
Orientadora

Prof.ª Dra. Larissa Canhadas Bertan – UFFS

Prof.ª Dra. Vânia Zanella Pinto – UFFS

DEDICATÓRIA

**Dedico à todos que estiveram me
apoiando neste momento.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por me fornecer forças para superar as dificuldades e seguir firme até o fim.

Ao meu noivo Leandro, que eu amo imensamente, agradeço por sempre me ajudar, apoiar e principalmente por ter paciência comigo, sem você eu não conseguiria chegar até aqui.

À minha Orientadora Luisa, pela dedicação, apoio, contribuição e empenho durante todo o período de estudo. À minha co-orientadora Sílvia, por toda a contribuição para com o desenvolvimento desse trabalho.

À minha família Inez, Moacir, Karoline e Gabriel, meu especial agradecimento, eu nada seria se não fosse por vocês, amo a todos.

À minha família de Laranjeiras que eu amo, Dona Leo e Seu Luiz, meus sogros que me acolheram como uma filha.

Ao meu cunhado Bruno e em especial a minha cunhada e melhor amiga Lais que esteve comigo em todos os momentos, me apoiando e ajudando, sei que posso contar com vocês sempre. Te amo amiga.

À Universidade Federal da Fronteira Sul do campus de Laranjeiras do Sul e a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos e dedicação.

À Secretaria Municipal de Educação do Goioxim, em especial a secretária Santina Motta, que sempre quando precisei liberação para os estudos nunca foi negada.

Aos meus amigos que ganhei com o projeto, Jessica, Milena, Luiz Vitor, Keveen e outros que foram fundamentais para construção deste trabalho.

À minha turma do mestrado de Ciência e Tecnologia de Alimentos, entre lágrimas e choros nos tornamos grandes amigas.

Agradeço a todos da Igreja Cristã Maranata, pelas orações, amizades e força durante todo esse período.

RESUMO

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas ao uso de aditivos naturais provenientes de extratos de plantas na alimentação de animais aquáticos. O alecrim apresenta atividade antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, modulador do sistema endócrino e metabólico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vivo* os efeitos da suplementação com extrato de alecrim sobre a fisiologia e a composição corporal do camarão (*Macrobrachium rosenbergii*). Foi realizada a suplementação na ração com os seguintes grupos: T0, T1, T2 e T3, nas concentrações 0%, 2%, 5% e 15% de extrato de alecrim respectivamente, no período de 90 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros: metabólicos Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT), sistema antioxidante e dano oxidativo (conteúdo de glutatona reduzida, atividade das enzimas glutatona redutase e glutatona S-transferase, e níveis de peroxidação lipídica e proteína carbonilada), parâmetros zootécnicos (taxa de sobrevivência, ganho em peso, ganho em comprimento). Foi realizada a caracterização da ração e a qualidade de água dos sistemas durante todo o período experimental. Ainda, foi avaliado a composição centesimal da ração e da carne com os seguintes parâmetros: umidade, cinzas, conteúdo de proteínas e lipídeos. A partir dos resultados obtidos, a suplementação de extrato de alecrim não influenciou os parâmetros zootécnicos nem a sobrevivência dos animais. Sobre os parâmetros metabólicos a enzima AST apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento T1 (2% de extrato de alecrim) em comparação com o controle T0. Já a ALT apresentou aumento significativo da atividade em todos os grupos com extrato de alecrim. Ocorreu redução dos níveis de glutatona reduzida com diferença significativa para a concentração mais elevada de extrato (15%). Ainda, ocorreram aumentos significativos da atividade da glutatona redutase para os grupos T2 (5%) e T3 (15%) e também aumento significativo na atividade da glutatona S-transferase em todas as concentrações de extrato de alecrim testadas. A suplementação aumentou significativamente os níveis de peroxidação lipídica no tratamento T3 enquanto não foram observadas alterações nos níveis de proteína carbonilada em nenhum dos grupos estudados. Em relação a composição centesimal da carne a suplementação promoveu alterações no conteúdo de lipídeos, com redução significativa em todos os grupos experimentais quando comparado ao grupo controle. Os resultados encontrados após a adição de extrato de alecrim na dieta e o tratamento *in vivo* indicam um potencial pró-oxidante do extrato de alecrim considerando as alterações do sistema de defesa antioxidante e de composição corporal observados. A partir do exposto torna-se necessário mais estudos com diferentes doses/períodos de suplementação em camarões para se determinar o real potencial antioxidante e/ou pró-oxidante do alecrim.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*. *Macrobrachium rosenbergii*. Antioxidantes. Metabolismo. Composição centesimal.

ABSTRACT

Several researches have been developed and directed to the use of natural additives from plant extracts in feeding aquatic animals. Rosemary presents antibacterial, antitumor, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, endocrine and metabolic modulator activity. The objective of the present work was to evaluate *in vivo* the effects of supplementation with rosemary extract on the physiology and body composition of shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*). The supplementation was carried out in the diet with the following groups: T0, T1, T2 and T3, in the concentrations of 0%, 2%, 5% and 15% of rosemary extract, respectively, during a 90-day period. The following parameters were evaluated: Aspartate aminotransferase (AST) and Alanine Aminotransferase (ALT) activities, antioxidant system and oxidative damage (reduced glutathione content, activity of glutathione reductase and glutathione S-transferase, and levels of lipid peroxidation and carbonylated protein), zootechnical parameters (survival rate, weight gain, length gain). The water quality of the systems was monitored during the whole experimental period. Also, the centesimal composition of the feed and the shrimp meat was evaluated with the following parameters: moisture, ashes, protein content and lipids. The supplementation of rosemary extract did not influence the zootechnical parameters nor the survival of the animals. On the metabolic parameters, the AST activity presented a significant difference ($p < 0.05$) in T1 treatment (2% of rosemary extract) compared to the T0 control. ALT activity showed significant increases in all groups with rosemary extract. There was a reduction in reduced glutathione levels with a significant difference for the highest concentration of extract (15%). Also, significant increases in the activity of glutathione reductase to T2 (5%) and T3 (15%) groups were verified and also a significant increase in glutathione S-transferase activity in all tested concentrations of rosemary extract compared with the control group. Supplementation significantly increased lipid peroxidation levels in T3 treatment whereas no changes in carbonylated protein levels were observed in any of the groups studied. In relation to the centesimal composition of the meat, supplementation promoted changes in lipid content, with a significant reduction in all experimental groups when compared to the control group. The results found after the addition of rosemary extract in the diet and *in vivo* treatment indicate a pro-oxidant potential of the rosemary extract considering the changes of the antioxidant defense system and body composition observed. From the above it is necessary to carry out further studies with different doses / periods of supplementation in shrimp to determine the actual antioxidant and / or pro-oxidant potential of rosemary.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*. *Macrobrachium rosenbergii*. Antioxidants. Metabolism. Centesimal composition.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Descrição morfológica de <i>M. Rosenbergii</i> | 19 |
| Figura 2 - Metabolismo de aminoácidos: Reação de transaminação e desaminação oxidativa.. | 22 |
| Figura 3 – Ilustração da síntese de glutathiona, estruturas da GSH e GSSG e do ciclo redox da GSH..... | 25 |
| Figura 4 - Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)..... | 27 |
| Figura 5 - Sistema de cultivo montado no laboratório de Patologia no campus de Laranjeiras do Sul na Universidade Federal da Fronteira Sul..... | 30 |
| Figura 6 - Sistema de cultivo montado na estufa agrícola no campus de Laranjeiras do Sul na Universidade Federal da Fronteira Sul..... | 30 |
| Figura 7 - Foto dos camarões para medir o comprimento..... | 36 |
| Figura 8 - (A) Atividade da enzima AST, (B) Atividade da enzima ALT no hepatopâncreas de camarão suplementados com diferentes concentrações de extrato de alecrim..... | 44 |
| Figura 9 - Concentração de Glutathiona reduzida (GSH) em hepatopâncreas de camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim..... | 47 |
| Figura 10 - Atividade da enzima Glutathiona redutase (GR) em hepatopâncreas de camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim..... | 47 |
| Figura 11 - Atividade da enzima Glutathiona S-Transferase (GST) em hepatopâncreas de camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim..... | 48 |
| Figura 12 – Níveis de Lipoperoxidação (LPO) em hepatopâncreas dos camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim..... | 50 |
| Figura 13 - Níveis de Proteína Carbonilada – PC em hepatopâncreas dos camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim..... | 50 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Parâmetros da qualidade de água do experimento. | 40 |
| Tabela 2 - Composição centesimal das rações com as diferentes concentrações de extrato de alecrim..... | 41 |
| Tabela 3 - Parâmetros zootécnicos de camarão tratados com suplementação da ração em diferentes concentrações de alecrim..... | 43 |
| Tabela 4 - Composição centesimal da carne dos camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim..... | 52 |

LISTA DE SIGLAS

aa: Aminoácidos

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

a_w : Atividade de água

BHT: Hidroxitolueno Butilado

CAT: Catalase

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CF: Comprimento Final

CI: Comprimento Inicial

DHA: Ácido docosahexaenóico

DIC: Delineamento Inteiramente Casualizado

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

DTNB: 5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)

DTPA: Ácido dietilenotriaminopentaacético

EPA: Ácido eicosapentaenoico

ERN_s: Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO_s: Espécies Reativas de Oxigênio

FC: Fator de Condição

GC: Ganho de Comprimento

GP: Ganho em Peso

GR: Glutathione Redutase

GSH: Glutathione Reduzida

GSSG: Glutathione Oxidada

GST: Glutathione S-Transferase

LPO: Lipoperoxidação

MDA: Malondialdeído

NADH: Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina Reduzido

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NH₃: amônia

OD: Oxigênio dissolvido

PBS: Tampão Fosfato-Salino

PF: Peso Final

PI: Peso Inicial

PL: Pós-larvas

PLP: Pirodoxal-fosfato

SOD: Superóxido Dismutase

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido Tricloroacético

TS: Taxa de Sobrevida

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1. Objetivo Geral | 16 |
| 1.2. Objetivos Específicos | 16 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1. Camarão <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | 17 |
| 2.2. Metabolismo dos camarões | 20 |
| 2.3. Sistema de defesa antioxidante | 24 |
| 2.4. Alecrim | 27 |
| 3. METODOLOGIA | 28 |
| 3.1. Local, Instalações e qualidade de água | 28 |
| 3.2. Obtenção do extrato de alecrim | 30 |
| 3.3. Preparo e Caracterização da ração | 31 |
| 3.4. Teste de preliminar de aceitação | 34 |
| 3.5. Estudo in vivo | 34 |
| 3.6. Parâmetros zootécnicos | 35 |
| 3.7. Análises Bioquímicas | 36 |
| 3.8. Composição centesimal | 39 |
| 3.9. Análise estatística | 39 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 40 |
| 4.1. Qualidade da água dos sistemas | 40 |
| 4.2. Caracterização das rações | 40 |
| 4.3. Crescimento e sobrevivência dos animais | 42 |
| 4.4. Análises metabólicas | 43 |
| 4.5. Análise centesimal da carne do camarão | 52 |
| 5. CONCLUSÕES | 54 |
| 6. REFERÊNCIAS | 55 |
| 7. ANEXOS | 64 |

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado atingiu cerca de 171 milhões de toneladas em 2016, das quais a aquicultura representou 47% do total. O consumo mundial de pescado vem crescendo sendo que entre 1961 e 2016, o aumento anual médio do consumo mundial de pescado foi de 3,2%, excedendo o crescimento populacional de 1,6%. Em termos *per capita*, o consumo de pescado aumentou de 9,0 kg em 1961 para 20,2 kg em 2015. Na produção mundial de pescados a China se destaca, sendo previsto para 2030 aproximadamente 80 milhões de toneladas para este país, sendo que para o Brasil esperase 2 milhões de toneladas. Dentro da aquicultura, a carcinicultura é considerada uma das principais atividades devido ao elevado valor econômico do produto. A maior produção é registrada nos países da América Latina e Leste e Sudeste da Ásia (FAO, 2018).

Considerando a carcinicultura de água doce, o gênero *Macrobrachium* possui mais de 120 espécies e está presente nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Algumas delas são exploradas pela pesca e usadas na aquicultura e grande parte da carcinicultura desse gênero está focada na espécie *Macrobrachium rosenbergii*, originária do oeste do indo-pacífico (TOYAMA, 2013). No Brasil a espécie *Macrobrachium rosenbergii* se destaca na escala comercial, pois apresenta como vantagens para o cultivo a grande rusticidade, precocidade e fecundidade, tolerância a diferentes taxas de salinidade e temperatura e resistência à doenças além do fato de não ser agressivo e a qualidade da carne é considerada superior a carne do camarão marinho.

Durante o cultivo, a condição metabólica e nutricional dos camarões exerce um fator especialmente importante na resposta de desempenho, uma vez que os requerimentos nutricionais se modificam ao longo das diferentes fases de desenvolvimento do animal (NUNES; SÁ, 2010). Além disso, a manutenção da homeostase corporal é essencial para uma maior resistência às condições de cultivo e maior produtividade. Ainda existem poucos estudos sobre as necessidades energéticas e nutricionais dos camarões de água doce, mas sabe-se que proteínas, carboidratos e lipídeos são essenciais para o funcionamento adequado das funções fisiológicas e metabólicas dos animais (BOELTER, 2010).

Levando isso em consideração, vem crescendo o interesse na busca por alternativas que possam ser adicionadas à dieta na tentativa de melhorar o status metabólico e de homeostasia corporal, favorecendo assim o crescimento e a obtenção de maior número de animais bem como melhor qualidade em termos de composição corporal. Neste sentido, aditivos que influenciem os sistemas de homeostasia corporal, como por exemplo o sistema antioxidante apresenta grande potencial de pesquisa. O sistema de defesa antioxidante nos organismos vivos pode ser dividido em dois tipos, um representado por enzimas (sistema enzimático) e o outro por moléculas de baixo peso molecular (sistema não enzimático) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Ambos os sistemas atuam em conjunto a fim de evitar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou de nitrogênio (ERNs), neutralizar estas espécies reativas e/ou reparar os danos ocasionados por elas (LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Quando ocorre um desequilíbrio entre a formação das espécies reativas e a ação do sistema de defesa instala-se a condição de estresse oxidativo, na qual ocorrem danos às proteínas, lipídeos e DNA acarretando em alterações no funcionamento das células e consequentemente do organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Atualmente é crescente o interesse sobre o potencial de substâncias oriundas de plantas como aditivos alimentares para organismos aquáticos não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pelo imenso potencial de atividade farmacológica que possuem (SIMÕES et al., 2007).

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*) apresenta grande variedade de compostos sendo predominantes em extratos os compostos fenólicos, di e triterpenos e óleos essenciais. Entre as atividades biológicas descritas para o alecrim destacam-se antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, moduladora do sistema endócrino e metabólico, antidiabética e moduladora do sistema nervoso central (ANDRADE et al., 2018). Apesar dos benefícios comprovados existem poucos relatos na literatura sobre o uso do extrato de alecrim em organismos aquáticos como peixes em termos metabólicos e fisiológicos (YILMAZ et al., 2013; HERNÁNDEZ et al., 2015), enquanto em crustáceos não há relatos na literatura científica. Os trabalhos disponíveis

abordam a ação do extrato de alecrim em mamíferos onde foram observados efeitos moduladores do metabolismo como atividade antidiabética, hepatoprotetora e antiadipogênica (AL-JAMAL; ALQADI, 2011; CUI et al., 2012; GAYA et al., 2013; HERNÁNDEZ et al., 2015).

Tendo em vista o potencial do extrato de alecrim como modulador metabólico, o uso desta planta como suplemento na ração do camarão de água doce pode contribuir para a melhorar a condição fisiológica e metabólica dos animais durante o cultivo, melhorando a resistência dos animais a condições estressantes, acelerando o desenvolvimento e contribuindo para melhora da composição corporal e qualidade da carne pós-despesca.

1.1. Objetivo Geral

Avaliar *in vivo* os efeitos da suplementação com extrato de alecrim sobre a fisiologia e a composição corporal do camarão *Macrobrachium rosenbergii*.

1.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a composição centesimal da ração suplementada com diferentes concentrações de extrato de alecrim.
2. Avaliar a influência do extrato de alecrim na sobrevivência dos animais, bem como no crescimento durante o período de suplementação.
3. Estudar o efeito da suplementação da ração com extrato de alecrim sobre o status antioxidante do camarão *M. rosenbergii*.
4. Avaliar os efeitos do tratamento com extrato de alecrim sobre a composição centesimal da carne do camarão *M. rosenbergii*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Camarão *Macrobrachium rosenbergii*

Os camarões do gênero *Macrobrachium* são os maiores da família *Palaemonidae*, podendo atingir 32 cm e pesar 500 g. Esse gênero possui mais de 120 espécies e ocorre nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Além disso algumas das espécies do gênero são exploradas pela pesca e usadas na aquicultura. Grande parte da carcinicultura desse gênero está focada na espécie *Macrobrachium rosenbergii* (TOYAMA, 2013) sendo que esta foi uma das primeiras espécies dulcícolas a se tornar cientificamente conhecida (VALENTI, 2002; NEW et al., 2010).

A espécie *M. rosenbergii* é bentônica, de água doce, que habita os fundos de rios, lagos, reservatórios e estuários. A temperatura ideal para a espécie é em torno de 28 à 30 °C, sendo que temperaturas abaixo de 15 °C são letais. Na natureza apresenta dieta onívora, alimentando-se de vermes, moluscos, larvas, insetos aquáticos, algas, plantas aquáticas, folhas, sementes e frutas sendo que a falta de alimento pode levar ao canibalismo (HELDT et al., 2012).

A entrada do *M. rosenbergii* no Brasil se deu em 1977, mas o cultivo com fins comerciais só se iniciou em meados da década de 80 e, a partir desta data, foi disseminado para quase todos os estados brasileiros (HELDT et al., 2012). A criação de camarões de água doce é relativamente mais simples do que a carcinicultura marinha, sendo realizada em propriedades de pequeno, médio e grande porte. A produtividade varia conforme o sistema de cultivo empregado e as condições climáticas. A produção está bem desenvolvida e o camarão atinge bons preços nos mercados nacionais e internacionais devido ao tamanho e sabor da carne. As instalações necessárias para a criação causam menor impacto ambiental quando comparadas ao camarão marinho, que utiliza área de mangues para a construção de viveiros de cultivo (NEW; VALENTI, 2000). Além disso, o crustáceo pode ser cultivado em associação com espécies de peixes dulcícolas, diversificando a fonte de renda e aumentando a rentabilidade da produção (VALENTI, 2001).

Basicamente o cultivo de camarões de água doce envolve três fases distintas: larvicultura, berçário e crescimento final (que também é chamada de engorda). A larvicultura compreende o período de desenvolvimento das larvas até completarem a metamorfose e chegarem à fase de pós-larvas (PL). Na fase de berçário, as PL são estocadas em tanques ou viveiros por 15 a 60 dias, quando atingem o estágio de juvenil. No crescimento final, os juvenis são estocados em viveiros de água doce com fundo de terra até atingirem o tamanho adequado para sua comercialização (VALENTI, 2002a). Ainda, o período de cultivo, dependendo das condições climáticas e nutricionais oferecidas, tem duração de 4 a 6 meses, permitindo duas produções ao ano, conforme a região.

Sobre a morfologia dos camarões, eles apresentam um corpo dividido em duas porções distintas: cefalotórax e abdômen, como mostra a Figura 1. Praticamente todos os órgãos vitais do camarão situam-se no cefalotórax, onde o sistema digestivo é formado pela boca, esôfago, estômago e intestino (BROWN et al., 2010). O processo digestivo consiste da captura do alimento e trituração do mesmo no estômago. Após, o alimento é filtrado e no hepatopâncreas ocorre a digestão de proteínas, gorduras e carboidratos. A absorção dos alimentos ocorre no próprio hepatopâncreas e no intestino médio (PICOLO, 2013).

No trato digestivo está localizado o maior órgão do animal, o hepatopâncreas, que apresenta funções vitais, envolvido em diversas atividades metabólicas (GIBSON; BARKER, 1979). Este órgão está envolvido na manutenção do balanço de sais e íons, metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos, remoção de corpos estranhos do sistema vascular, destoxificação de metais e outras substâncias orgânicas, secreta enzimas digestivas que são derramadas no estômago, armazena substâncias úteis e controla a composição bioquímica corporal (ICELY; NOTT, 1992; GIBSON; BARKER, 1979).

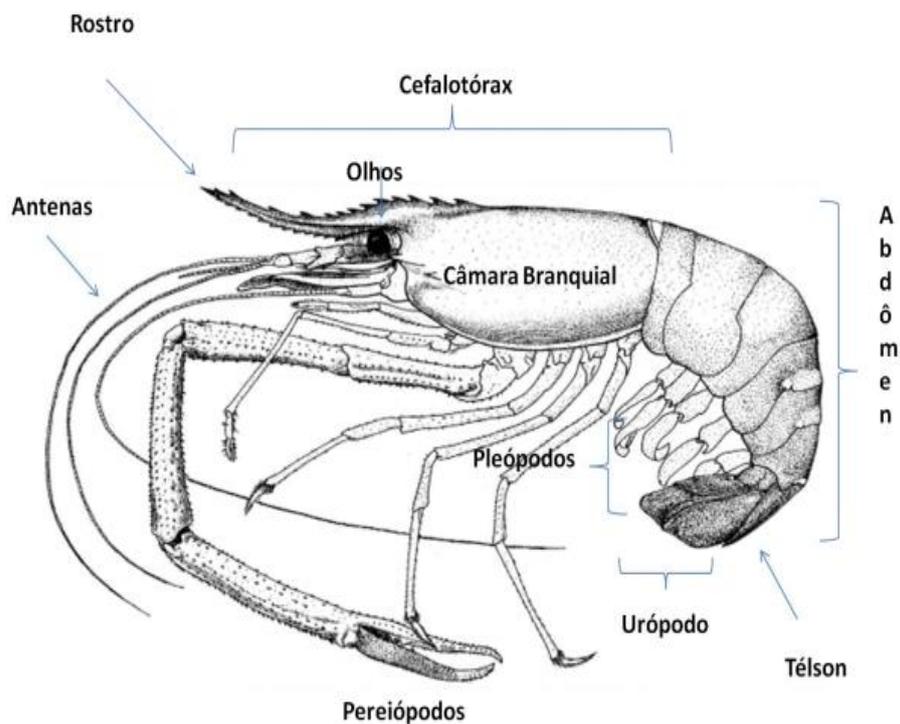


Figura 1- Descrição morfológica de *M. rosenbergii*. Fonte: HELDT et al., 2012.

O abdômen é recoberto por uma placa transversal dorsal denominada tergo e uma ventral chamada esterno, ligadas em ambos os lados por duas placas laterais denominadas pleuras. As pleuras nas fêmeas se prolongam para baixo, cobrindo parcialmente as extremidades e formando a câmara incubadora abdominal, onde são depositados os ovos durante o desenvolvimento embrionário. Possui também seis pares de apêndices abdominais, sendo o primeiro ao quinto denominados pleópodos e o sexto urópodos que juntamente com o télson formam um leque caudal, que auxilia no rápido deslocamento do animal (HELDT et al., 2012).

A carne do camarão é excelente fonte de proteínas, ácidos graxos insaturados como eicosapentaenóico (20:5n-3 EPA) e docosahexaenóico (22:6n-3, DHA). É também fonte de minerais como magnésio, cálcio e ferro. Outros compostos encontrados na carne são os pigmentos carotenóides, destacando-se a concentração de astaxantina e seus

ésteres, responsáveis pela cor rosada (SEABRA, 2004). A composição centesimal do camarão de água doce *M. rosenbergii* é de aproximadamente 76,2% de umidade, 20,7% de proteína, 0,7% de lipídios e 1,2% de cinzas. Além disso, o *M. rosenbergii* apresenta em média um total de 40 ácidos graxos, destacando-se o palmítico-16:0 (18,2%), EPA (13,9%), oléico-18:1n-9 (9,4%), linolênico-20:3n-3 (9,5%) e DHA (6,5%) (FURUYA et al., 2006). Além disso, quando comparado com o camarão marinho, o camarão de água doce apresenta maiores concentrações de lipídeos (3,18% versus 1,33%), triglicerídeos (730 versus 213 mg/g de gordura) e ácidos graxos poli-insaturados (16,2% versus 2,9%) (NEW et al., 2010). Ainda, alguns autores relataram que o camarão *M. rosenbergii* apresenta teores de colesterol e iodo menores que o camarão marinho, variando de 0,71 a 0,98 mg/g em comparação com 1,25 mg/g para o camarão marinho, enquanto os valores de iodo foram de 0,14 mg/kg para camarão de água doce em comparação com 0,80 mg/kg para camarão marinho (D'ABRAMO et al.; 1993; SILVA et al.;1989; BRAGAGNOLO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

2.2. Metabolismo dos camarões

A compreensão do metabolismo destes animais é importante para os estudos de criação de camarões. O metabolismo consiste de um conjunto de atividades celulares altamente coordenadas, envolvendo muitos sistemas multienzimáticos (vias metabólicas) que cooperam entre si para obter energia degradando nutrientes energeticamente ricos obtidos do meio ambiente e também convertendo as moléculas dos nutrientes em moléculas com características próprias de cada célula, sendo definido como a soma de todas as transformações químicas que ocorrem (NELSON; COX, 2014). Pode-se dividir o metabolismo em duas partes: o catabolismo e o anabolismo. O catabolismo é a fase de degradação na qual moléculas orgânicas (carboidratos, proteínas e gorduras) são convertidas em produtos finais menores e mais simples (ácido láctico, CO₂ e NH₃) e onde há produção de energia. E o anabolismo, também chamado de biossíntese, consiste na transformação de precursores pequenos e simples em moléculas maiores e mais complexas, incluindo lipídeos, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, necessitando de fornecimento de energia (NELSON; COX, 2014).

Os camarões podem utilizar tanto proteínas como carboidratos e lipídios para obter a energia necessária para seus processos fisiológicos. Uma dieta alimentar é considerada ótima quando tem seus teores de proteínas, de lipídios e de carboidratos balanceados atendendo de forma homogênea as necessidades do animal (BOELTER, 2010).

As proteínas são nutrientes muito importantes na dieta, pois são responsáveis pelo crescimento, pela formação de enzimas, hormônios, entre outras funções. De uma forma geral, os animais aquáticos possuem necessidades proteicas mais elevadas do que outros animais (LEMOS et al., 2000). Camarões tem índices de crescimento satisfatórios com rações contendo entre 25 e 60% de proteínas, variando em cada fase da vida (CUZON et al., 2004). Os níveis dependem da espécie do animal, estado fisiológico, tamanho, hábitos alimentares, da natureza das proteínas utilizadas, do sistema de cultivo, temperatura e salinidade da água (NUNES; SÁ, 2010). O alimento aquático geralmente é escasso em carboidratos e abundante em lipídios e proteínas o que provavelmente é o fator responsável pela tendência dos organismos aquáticos em usarem proteína como fonte de energia (BOELTER, 2010).

O metabolismo proteico possui três fontes de aminoácidos (aa) sendo elas, a via dietética, a quebra de proteína corporal e a biossíntese de aa não essenciais. A composição de aa livres varia de acordo com a composição proteica da alimentação e o padrão da composição de aa presentes no sangue e nos tecidos dos camarões varia de acordo com o período com alimentação e em jejum (JURS, BASTROP, 1995). Após o transporte os aa são metabolizados ou usados para síntese de proteínas ou compostos nitrogenados. As duas principais reações no metabolismo dos aa são a transaminação que é uma reação caracterizada pela transferência de um grupo amino de um aminoácido para um cetoácido, e a desaminação oxidativa que é o processo pelo qual o aminoácido libera o seu grupo amino na forma de amônia e se transforma em um cetoácido (Figura 2). Estas reações são catalisadas pelas enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e glutamato desidrogenase (CAMPBELL, 2015). Todas as aminotransferases necessitam de pirodoxal-fosfato (PLP) como cofator (NELSON; COX, 2014).

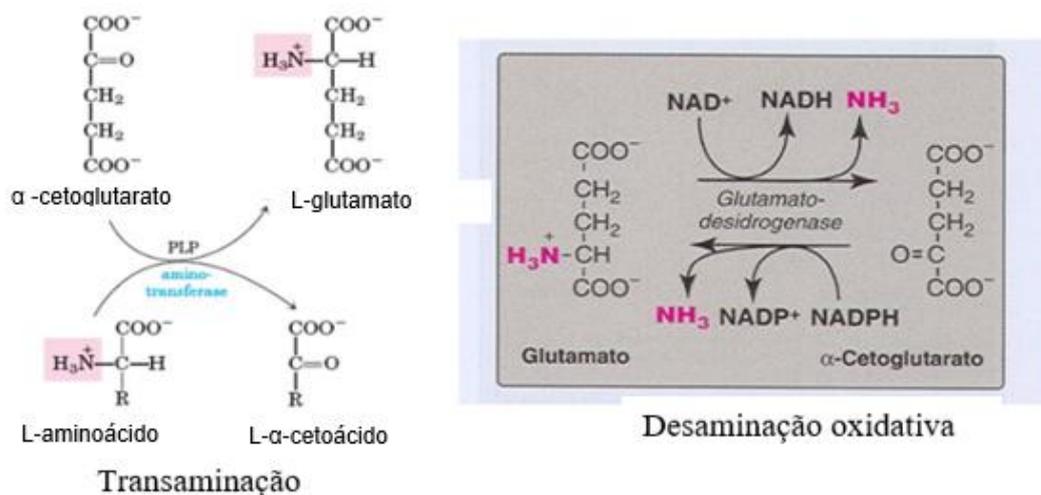


Figura 2 - Metabolismo de aminoácidos: Reação de transaminação e desaminação oxidativa.
 Fonte: Nelson; Cox, 2014.

Estas enzimas, em especial a ALT e AST, desempenham papel essencial atuando na síntese e degradação de aminoácidos. Ambas apresentam ampla distribuição tecidual, sendo a ALT encontrada em maiores concentrações no citosol das células hepáticas, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. Por outro lado a AST está presente no citosol e mitocôndrias das células, estando em concentrações mais altas no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas (GONZÁLES; SILVA, 2006; NELSON; COX, 2014).

Para que as células possam aproveitar da melhor maneira possível os nutrientes e isso seja refletido no desenvolvimento do organismo, a manutenção da homeostasia corporal é extremamente importante. Quando se considera o metabolismo aeróbico, diversas rotas metabólicas podem servir como geradoras de moléculas potencialmente prejudiciais ao funcionamento das células, as conhecidas espécies reativas e radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Define-se como espécie reativa toda molécula altamente reativa, com elétrons desemparelhados (radical livre) ou não, que apresenta elevada instabilidade. Como exemplo de espécies reativas tem-se as derivadas

de oxigênio (EROs) como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroperoxil (HOO^{\cdot}), peroxil (ROO^{\cdot}), alcoxil (RO^{\cdot}), oxigênio singleto, bem como espécies reativas derivadas de nitrogênio como o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (LEE; LEE, 2006; TUDEK et al., 2010; ZIECH et al. 2011).

As reações que produzem esses intermediários podem ocorrer em qualquer local da célula, tendo nas mitocôndrias um dos locais mais importantes de geração de espécies reativas de oxigênio em função da cadeia respiratória. O processo de formação de EROs na mitocôndria consiste principalmente da redução incompleta da molécula de oxigênio. A entrada de quatro elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento de duas moléculas de água, porém a entrada de um número menor de elétrons gera redução parcial do oxigênio, dando origem a moléculas instáveis como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}) (ROVER JUNIOR, et al., 2001).

Como são moléculas altamente instáveis, estas espécies reativas doam ou recebem elétrons de outras moléculas na tentativa de se estabilizarem. Os alvos para transferência ou retirada de elétrons consistem basicamente de lipídeos de membrana, do DNA e das proteínas (ROVER JUNIOR et al., 2001) o que acarreta em danos estruturais significativos nestas moléculas e conseqüentemente alterações em seu funcionamento (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Para proteger as células dos danos provocados pelas espécies reativas, os organismos dispõem de um complexo sistema de defesa. Para que seja possível a manutenção do equilíbrio metabólico o sistema de defesa antioxidante age neutralizando as espécies reativas. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, seja pela diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, é estabelecida a condição chamada de estresse oxidativo, um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares (GUTTERIDGE, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

2.3. Sistema de defesa antioxidante

As defesas antioxidantes dos organismos podem ser divididas em dois grupos, enzimáticas e não enzimáticas. O sistema enzimático envolve as enzimas do ciclo redox da glutathione, a glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione S-transferase (GST) (BARREIROS et al., 2006). Além destas, a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio e a catalase (CAT) que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água constituem as principais enzimas antioxidantes dos sistemas biológicos (BABIOR, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Já o sistema não enzimático é constituído por moléculas endógenas e exógenas, naturais ou sintéticas, que protegem alvos biológicos da oxidação por apresentarem uma das três propriedades: supressão da formação de radicais livres, eliminação de radicais livres ou ainda desativação, formando um produto estável e participação em processos de reparo (RIBEIRO et al., 2005). Entre os antioxidantes não enzimáticos mais conhecidos destacam-se a glutathione, as vitaminas E (α -tocoferol) e C (ácido L-ascórbico). Dentre estes, destaca-se a glutathione, que é um tripeptídeo formado por ácido γ -glutâmico, cisteína e glicina (GSH), e desempenha várias funções: quelante de radicais livres, reagindo diretamente com estes ou indiretamente como cofator de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase (GPx) ou ainda como doadora de elétrons para neutralização de espécies reativas ou atuação no processo de biotransformação de xenobióticos por conjugação via GST (figura 3) (PASTORE et al., 2003). No processo de neutralização de espécies reativas, como por exemplo do peróxido de hidrogênio, a glutathione (GSH) transfere elétrons ao H_2O_2 formando glutathione oxidada (GSSG) e água, reação catalisada pela enzima glutathione peroxidase (GPx) (APEL; HIRT, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; TEKMAN et al., 2008). Com a finalidade de manter o status redox da GSH, a glutathione redutase utiliza uma molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) como fonte de elétrons e prótons para reduzir a GSSG gerada, e dessa forma regenerar a GSH intracelular (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

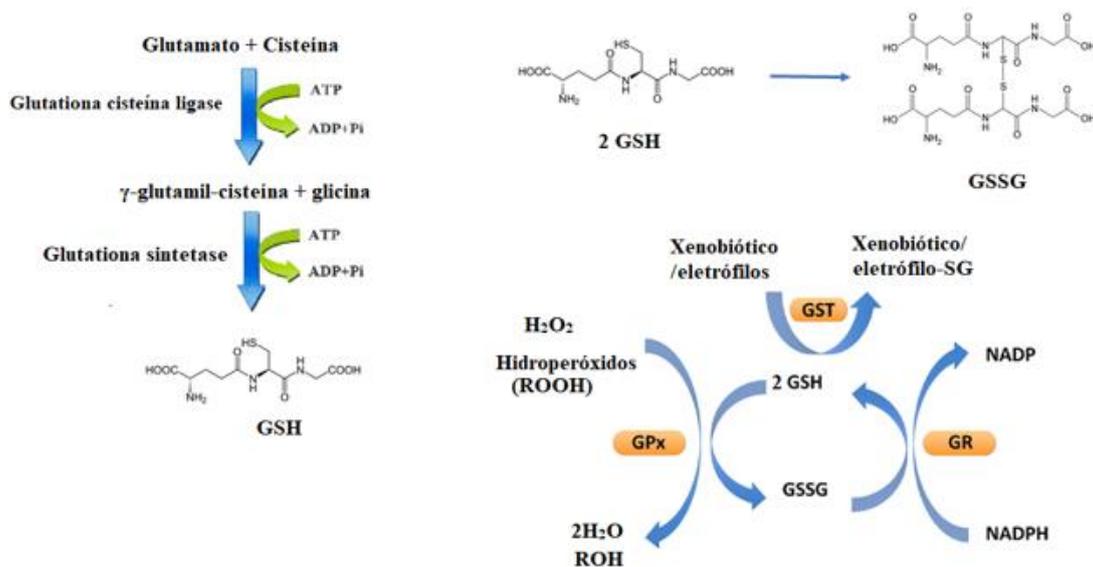


Figura 3 – Ilustração da síntese de glutatona, estruturas da GSH e GSSG e do ciclo redox da GSH. Fonte: Adaptado de Rover Junior et al., 2001.

A vitamina E é uma molécula lipossolúvel e tende a se concentrar no interior das membranas, agindo sinergicamente com o ascorbato (MEISTER; ANDERSON, 1983). É um potente removedor de radicais peroxila e provavelmente, o mais importante inibidor da reação em cadeia da lipoperoxidação (retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos polinsaturados de membrana). A vitamina C é considerada o mais potente antioxidante hidrossolúvel já que é um potente agente redutor, capaz de reduzir a maioria das EROs/ERNs como por exemplo, radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e oxigênio singleto, e também regeneradora de vitamina E. Como é hidrossolúvel possui maior ação no citosol das células e no plasma sanguíneo enquanto a vitamina E tem ação maior em membranas celulares por ser lipossolúvel (RIBEIRO et al., 2005).

As espécies reativas produzidas nas células não provocam apenas prejuízos ao organismo, mas também à indústria alimentícia, por meio da peroxidação lipídica, a qual promove alterações indesejáveis no sabor e odor do produto, além de originar produtos potencialmente tóxicos (LIN e LIANG, 2002). Os antioxidantes são úteis em retardar a peroxidação lipídica e seus produtos secundários. Com isso mantêm o sabor, a textura e,

em alguns casos, a cor do produto durante seu período de estocagem (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011). Ainda, antioxidantes reduzem a oxidação das proteínas, bem como a sua interação com grupos carbonil, responsáveis por alterações na funcionalidade das mesmas (ELIAS et al., 2008).

Atualmente apresenta-se uma demanda por novas formas de manejo que possam trazer resultados positivos nas condições metabólica e fisiológicas dos animais durante o ciclo produtivo refletindo em maiores índices de crescimento e sobrevivência. Diante disto, a manipulação da dieta com a adição de aditivos que possam estimular a atividade metabólica em geral e também melhorar o status antioxidante dos animais são de especial interesse (YOUSEFI et al., 2019).

É grande o interesse sobre o potencial de substâncias oriundas de plantas como suplementos alimentares para organismos aquáticos. As fontes vegetais, em especial as plantas, são ricas em substâncias conhecidas como metabólitos secundários que desempenham diversas funções nos organismos vegetais como por exemplo a defesa e proteção da planta contra agentes agressores, atração de polinizadores, alelopatia dentre outras. Assim, despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas nas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pelo imenso potencial de atividade farmacológica que possuem (SIMÕES et al., 2007).

Os compostos antioxidantes naturais são isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes, sendo componentes naturalmente presentes nos alimentos como flavonoides, precursores de lignanos, ácidos fenólicos, terpenos, tocoferóis e fosfolipídeos. Os compostos fenólicos são um dos maiores grupos de componentes dietéticos que estão associados com a inibição da oxidação em alimentos e em sistemas biológicos, sendo substâncias bioativas que ocorrem largamente em alimentos de origem vegetal e muitos deles são boas fontes de antioxidantes naturais (SCHIRCH; MANCINI-FILHO, 2000).

2.4. Alecrim

Pertencente à família *Lamiaceae*, o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), também conhecido como alecrim-da-horta, alecrim-de-jardim, alecrim-de-cheiro, alecrim-rosmarinho, uma planta originária do Sul da Europa e do Norte da África. Trata-se de um arbusto de pequeno porte, ramificado, possui hastes lenhosas e sempre verde, folhas pequenas, finas e de sabor picante (Figura 4) (MAY et al., 2010). É uma planta utilizada para fins culinários, medicinais e aromáticos, exalando forte aroma (MARTINS et al., 1998).



Figura 4 - Alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Fonte: <http://perdido.co/2014/03/herbarium-alecrim/>

O alecrim tem sido amplamente utilizado pela indústria alimentícia e farmacêutica devido às suas propriedades aromáticas, antioxidante, antimicrobiana e antitumoral. A atividade antioxidante do alecrim é atribuída a um grande número de compostos fenólicos, sendo os três principais grupos encontrados na planta os diterpenos, flavonoides e ácidos fenólicos. Destes, o ácido carnósico, o carnosol, os diterpenos e o ácido rosmarínico são os principais compostos antioxidantes presentes (CUVELIER et al., 2000, DOOLAEGE et al., 2012; HAAK et al., 2009). Esse efeito se deve principalmente à capacidade dos constituintes fenólicos de doar hidrogênio para os radicais livres, formando radicais estáveis, e também em parte à capacidade de sequestrar radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000).

Em estudo realizado por Schirch; Mancini-Filho (2000) foi avaliado a atividade antioxidante de diferentes métodos de extração do alecrim em sistema *in vitro* β -caroteno/ácido linoléico sendo verificado que o extrato alcoólico apresentou melhor atividade antioxidante em relação ao etéreo e ao aquoso comum, com média de 73,15% de proteção em 100% de oxidação do β -caroteno. Esses autores também demonstraram que os compostos fenólicos da fração solúvel apresentaram um efeito antioxidante de 92,2% em uma concentração de 20 μ L/mL, sendo superior ao BHT, que com o mesmo volume apresentou 60,2% de proteção. Além disso, Del Baño et al. (2003) verificaram alta correlação ($r^2 > 0,96$) entre fatores de proteção e a quantidade de diterpenos fenólicos no extrato de alecrim em pó, tanto em sistema aquoso como lipídico, especialmente devido ao ácido carnósico e o carnosol, sendo responsáveis pela alta atividade antioxidante do extrato de alecrim.

Em termos de estudos *in vivo*, Aiura (2007) avaliou adição de 0,14% de extrato de alecrim na ração de Tilápias do Nilo e demonstrou que a adição promoveu um menor teor de lipídeos (1,52%) nos filés em relação aos sem extrato (1,77%) e também melhorou a proteção contra a oxidação. Além disso, a suplementação de tilápias com alecrim na concentração de 1% aumentou o ganho de peso e a taxa de crescimento dos animais em comparação com o grupo controle (HASSAN et al., 2018). Já os estudos de Yousefi et al., (2019) com o pó de folhas de alecrim na dieta em alevinos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) demonstrou um aumento de crescimento e da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase após o período de suplementação. No entanto, no mesmo experimento não foram observadas alterações de composição corporal/ centesimal dos animais.

3. METODOLOGIA

3.1. Local, Instalações e qualidade de água

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, campus Laranjeiras do Sul, PR. Os camarões de água doce *M. rosenbergii* utilizados durante a execução do presente trabalho foram provenientes da

unidade amostral de carcinicultura de água doce em estufa agrícola da UFFS campus Laranjeiras do Sul.

A fim de garantir a qualidade dos sistemas, foram utilizados sistemas fechados de recirculação de água, com biofiltros em fluxo contínuo, utilizando bomba com capacidade de vazão média de 200 L/h.

Para a realização do experimento foram utilizados dois sistemas de circulação. No primeiro sistema, os biofiltros foram montados em caixas d'água com capacidade para 150 L. No interior dos biofiltros foram inseridas pedras britadas e partículas/pedaços de tubulações de eletrodutos, cortados de maneira homogênea, com dimensões de 2 cm. Os biofiltros ainda contaram com aeração contínua e aquecedor com termostato, visando a manutenção de boas taxas de oxigênio dissolvido (OD) e temperatura da água constante. Fizeram parte da estrutura do experimento 16 aquários com capacidade para 50 L cada. Neste primeiro sistema, os animais foram mantidos por 45 dias no laboratório de Patologia como mostra a Figura 5 e posteriormente transferidos para o segundo sistema montado de maneira idêntica ao primeiro só que utilizando caixas d'água de 150 L na estufa agrícola do campus a fim de melhorar o crescimento dos animais (Figura 6). Diariamente foram registrados a temperatura e oxigênio dissolvido (OD), através de um medidor devidamente calibrado sempre antes usar. Quinzenalmente foram mensurados os parâmetros de amônia, nitrato e nitrito através do kit INDOTEST Alfakit, com leitura em 630 nm.

A alcalinidade da água dos dois sistemas de cultivo foi determinada por titulação ácido base, usando o ácido clorídrico 0,05M como titulante, carbonato de sódio 0,1M, e o alaranjado de metila como indicador segundo metodologia do *Standart of Methods for the Examination of Water and Wasterwater* (APHA,1995). Para a determinação da dureza da água dos mesmos sistemas de cultivo, foi utilizado o método de APHA (1995) com uma solução padronizada de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,01M como titulante, a solução tampão hidróxido de amônio pH 10 e negro de eriocromo T como indicador. O pH também foi determinado através do pHmetro devidamente calibrado com as soluções tampões.



Figura 5 - Sistema de cultivo montado no laboratório de Patologia no campus de Laranjeiras do Sul na Universidade Federal da Fronteira Sul. Fonte: Registrado pela autora, 2019.



Figura 6 - Sistema de cultivo montado na estufa agrícola no campus de Laranjeiras do Sul na Universidade Federal da Fronteira Sul. Fonte: Registrado pela autora, 2019.

3.2. Obtenção do extrato de alecrim

Para o preparo do extrato de alecrim, foi adquirido o alecrim verde seco em pó da empresa Flora Ervas Comercial LTDA (São José dos Pinhais/Paraná). A partir do pó seco

do alecrim foi realizada extração por agitação magnética, por 12 à 15 horas, utilizando como solvente etanol 70%, razão planta:solvente de 1:10 (p/v). A solução extrativa obtida foi filtrada através da bomba de vácuo com filtro de papel (200 mm), o solvente removido em rota- evaporador a 35 °C, até obter o extrato seco seguindo a metodologia adaptada de Gandra et al., (2013).

3.3. Preparo e Caracterização da ração

Foi realizado a adição do extrato de alecrim através da incorporação na ração, nas concentrações de 2%, 5% e 15%. Para isso, a ração comercial da marca Biobase com 40% de proteína, para camarões na fase pré-juvenil, foi moída e o extrato em pó foi adicionado. Na sequência, a ração foi novamente peletizada e seca em estufa. A caracterização da ração foi realizada através da análise de umidade, atividade de água, cinzas, conteúdo de proteína, conteúdo de lipídeos, carboidratos totais e teor de compostos fenólicos.

3.3.1. Umidade e Atividade de água

Para estas análises as amostras de ração T0 (sem adição de extrato), T1 (2% de extrato de alecrim), T2 (5% de extrato de alecrim) e T3 (15% de extrato de alecrim) foram trituradas e posteriormente pesadas em triplicatas. A atividade de água (a_w) foi realizada em triplicata para todos os tratamentos, sendo determinada segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Para umidade foi utilizado o método baseado na evaporação da água presente no alimento de acordo com *Association of Official Analytical Chemists* - AOAC (1995). Os cadinhos de porcelana foram previamente deixados em estufa a 105 °C por 2 horas, após esse período foram resfriados em dessecador por 30 minutos. Após, foi realizada a pesagem dos cadinhos que foram manipulados com auxílio de pinças para evitar contato com as mãos devido a passar gordura e umidade para os mesmos. Após serem pesados, foi adicionado a amostra aos cadinhos, anotando-se o peso até a quarta casa decimal. As amostras foram secas em estufa a 105 °C durante 24 horas, deixando esfriar em dessecador por 30 minutos e depois

foi realizada a pesagem da amostra seca. Foram realizados os cálculos para os teores de umidade e os valores foram expressos em porcentagem (%).

3.3.2. Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por incineração da matéria orgânica, de acordo com AOAC (1995). Primeiramente os cadinhos de porcelana vazios foram colocados na estufa a 105 °C durante 3 horas, para eliminação total da umidade, após foram deixados no dessecador por 30 minutos para posteriormente serem pesados. Foi adicionado em cada cadinho 3 gramas de amostra de ração triturada e levados para a mufla a 550 °C durante 12 horas, após a retirada foram deixados no dessecador e depois pesados. Foram realizados os cálculos para os teores de cinzas e os valores foram expressos em porcentagem (%).

3.3.3. Conteúdo de Proteína

Foi utilizado o método de Micro Kjeldahl para determinar o nitrogênio total, através da conversão em proteína pelo fator de conversão 6,25, que é utilizado para alimentos em geral (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Inicialmente foi pesado 0,2 g da amostra triturada de ração e adicionada ao balão de Kjeldahl com 1,5 g de mistura catalítica de sulfato de cobre e sulfato de potássio (1:3) e 7 mL de ácido sulfúrico concentrado, levando o balão ao conjunto digestor, onde a temperatura foi lentamente aumentada em intervalos de 50 °C a cada 15 min até 350 °C. A digestão ficou completa quando a solução ficou clara (verde claro) quase transparente (em torno de 4 horas). Depois o tubo macro Kjeldahl foi conectado no conjunto de destilação, a temperatura do destilador foi aumentada vagarosamente e também foi adicionado aos poucos a solução de hidróxido de sódio a 40% até a solução do tubo tornar-se escura (marrom “barro”). Na saída do condensador foi deixado um erlenmeyer com 25 mL de solução de ácido bórico (2%) com 3 gotas de indicador misto, onde foi coletado um volume de destilado de cerca de 50 mL. Por fim, o Erlenmeyer com o destilado foi usado para a titulação com solução

de HCl (0,1M) até a viragem, realizando o branco nas mesmas condições. A partir dos valores da titulação foram realizados os cálculos de proteína que foram expressos em porcentagem (%).

3.3.4. Conteúdo de Lipídeos

O conteúdo de lipídeos foi determinado através da extração a frio com o método de Bligh-Dyer (BLIGH DYER, 1959). Foram pesados 2 g de ração triturada em um béquer de 100 mL e adicionado 10 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol deixando no agitador rotativo por 30 minutos e em seguida foi adicionado mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% e deixando agitar por mais 5 minutos. Posteriormente deixou a solução em repouso para separação das fases. Descartou-se a camada superior e foi retirado 15 mL da camada inferior (clorofórmio) em um tubo de 30 mL adicionando-se em seguida 1 g de sulfato de sódio anidro, tampando e agitando para remover traços de água. Posteriormente esta solução foi filtrada e transferido 5 mL para um béquer de 50 mL previamente tarado, deixando na estufa a 80°C até evaporar o solvente (15-20 minutos) e por fim foi pesado em balança analítica. Foram realizados os cálculos para concentração de lipídeos e os valores expressos em porcentagem (%).

3.3.5. Conteúdo de Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram calculados por diferença dos demais componentes, usando-se a fórmula: $100 - (\text{proteína bruta} + \text{lipídeos totais} + \text{umidade} + \text{cinzas})$.

3.3.6. Teor de Compostos Fenólicos

A determinação de compostos fenólicos totais das rações foi realizada por meio do método espectrofotométrico com reagente Folin-Ciocalteu, de acordo com Bucic-Kojic *et al.* (2007) com modificações. Foi adicionado 5 mL de etanol a 1 g de ração, agitado em vórtex, centrifugado por 5 minutos a 3.000 rpm e repetido o processo uma

vez. Após, foi transferido 10 µL do sobrenadante para microplaca e adicionado 204 µL de água destilada e 44 µL de reagente de Folin-Ciocalteu a 10%, incubado por 5 minutos, e após adicionado 22 µL de carbonato de sódio a 7,5%. A microplaca foi mantida em repouso, na ausência de luz por 2 horas e posteriormente realizada leitura em comprimento de onda de 765 nm em espectrofotômetro, descontando o valor do branco de cada medida. Uma curva padrão foi elaborada com ácido gálico nas concentrações de 0; 2,5; 5; 7,5; 10 e 12,5 mg de EAG.mL⁻¹. Os resultados foram expressos em mg de Equivalente de Ácido Gálico/g de ração (mg EAG.g⁻¹) (KWIATKOWSKI et al., 2010).

3.4. Teste de preliminar de aceitação

Para determinação das concentrações do estudo *in vivo* foi realizado um teste de aceitabilidade/palatabilidade das rações tendo como referência os trabalhos de Aiura (2007) e Sant'Ana; Mancini-Filho (1999). Os camarões foram distribuídos em seis tanques, onde os grupos de tratamento foram: T1 com 0,25%, T2 - 0,5%, T3 - 2%, T4 - 5%, T5 - 10% e T6 com 15% de extrato de alecrim adicionado à ração (p/p). A alimentação dos animais considerou 10% da biomassa total (peso dos animais), divididas em duas alimentações diárias, pela manhã e pela tarde, durante cinco dias. Durante os cinco dias do teste foi observado a procura dos animais pelo alimento e as sobras de ração em cada tanque. Após o final do período de teste foi concluído que os grupos que apresentaram a maior procura pelo alimento e conseqüentemente o maior consumo de ração foram os grupos com as maiores concentrações de extrato de alecrim, principalmente T4 (5%), T5 (10%) e T6 (15%). A partir deste resultado preliminar foram determinadas as concentrações para uso no estudo *in vivo* de suplementação.

3.5. Estudo *in vivo*

O procedimento experimental foi realizado utilizando-se quatro tratamentos com quatro repetições cada, dispostos de forma completamente aleatória (DIC). Os animais foram divididos em diferentes grupos, controle e tratados: o grupo controle (T0) recebeu ração sem adição de extrato; o grupo de tratamento 1 (T1) recebeu ração balanceada

suplementada com 2% de extrato de alecrim; o grupo de tratamento 2 (T2) recebeu ração balanceada suplementada com 5% do extrato de alecrim; o grupo de tratamento 3 (T3) recebeu ração balanceada suplementada com 15% do extrato de alecrim. A ração foi fornecida em quantidade de 10% em relação a biomassa total, dividida em duas alimentações diárias, uma pela manhã e outra na parte da tarde. Foi realizada a limpeza dos aquários e caixas d'água por sifonagem pelo menos uma vez por dia, para retirada de sobras de alimento e fezes. Inicialmente, os animais foram dispostos em tanques com capacidade para 50 L sendo a densidade inicial de estocagem de 1,6 animais por litro (80 animais/tanque), totalizando 320 animais por tratamento. Após 45 dias, os animais foram transferidos para o segundo sistema de cultivo com caixas de 150 L. O período de suplementação teve duração de 90 dias sendo que neste período foi realizado o acompanhamento diário dos animais e da qualidade da água do sistema.

Ao final do período de suplementação os animais foram coletados, anestesiados em banho de gelo e eutanasiados por aprofundamento do estado anestésico em banho de gelo para posterior remoção dos órgãos (hepatopâncreas e músculo), sendo armazenados em ultrafreezer para avaliações bioquímicas e bromatológicas.

3.6. Parâmetros zootécnicos

Foram realizadas biometrias, no início e ao final do ensaio, mensurando peso e comprimento. Estes parâmetros foram determinados utilizando uma balança digital de elevada precisão e aquisição de imagens, como mostrado na Figura 7, para medição do comprimento no programa ImageJ. Diariamente, durante o período de suplementação, possíveis mortes foram contadas e os animais retirados dos aquários. Posteriormente foram calculados o crescimento total e sobrevivência dos animais.



Figura 7 - Foto dos camarões para medir o comprimento. Fonte: Registrado pela autora, 2019.

3.7. Análises Bioquímicas

As amostras de hepatopâncreas foram homogeneizadas com auxílio de um homogeneizador de tecidos em solução contendo PBS, pH 7,2 e centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, e os sobrenadantes separados para as determinações. Uma amostra de hepatopâncreas foi utilizada para determinação de GSH, sendo que as amostras foram homogeneizadas em solução de TCA 12%, centrifugadas e os sobrenadantes separados para as determinações.

4.6.1. Conteúdo de Proteína

O conteúdo de proteína foi determinado através do método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão e leitura da absorbância a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg/mL.

4.6.2. Atividade de Aminotransferases ou Transaminases

A atividade das aminotransferases nos sobrenadantes dos homogenatos foram determinadas utilizando Kits colorimétricos da marca Gold Analisa, sendo um para aspartatoamino-transferase (AST-TGO) e outro para a alanina-aminotransferase (ALT-TGP) seguindo as recomendações do fabricante e adaptados os volumes para microplaca. Os resultados foram expressos em U/L/mg proteína.

4.6.3. Glutathione redutase (GR)

A atividade da glutathione redutase (GR) foi determinada através da metodologia de Carlberg e Mannervik (1985). Consiste na oxidação do NADPH com a concomitante redução da glutathione oxidada (GSSG) e formação de glutathione reduzida (GSH). Foi pipetado na microplaca 10 µL de amostra em triplicata e adicionado 200 µL de meio de reação (Tampão Fosfato 0,1M pH 7 + NADPH 0,1 mM + DTPA 0,005M + GSSG 0,1 mM e água destilada). A leitura foi realizada após homogeneização da microplaca durante 4 minutos com intervalos de 10 segundos a 340 nm. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg proteína.

4.6.4. Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Habig, Pabst, Jacoby, (1974). A reação baseia-se na capacidade da GST em conjugar GSH no substrato, formando complexo mensurável em 340 nm, monitorada durante 3 minutos. A amostra foi adicionada ao meio de reação contendo 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) (substrato), GSH 0,1 M e tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 em microplaca de 96 poços. Os valores foram expressos em mM/min/mg de proteína.

4.6.5. Glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de glutathiona reduzida foram medidos em sobrenadante de homogenato de hepatopâncreas, preparado em 10 volumes de ácido tricloroacético 12%, seguido por centrifugação a 5000 xg durante 5 minutos. Todas as análises foram realizadas em duplicata, e mantidas em gelo durante todo o ensaio. Uma alíquota das amostras foi acrescentada em tampão fosfato 0,2 M pH 8,0. Após, DTNB 2,5 mM (5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) foi adicionado e a absorbância foi medida em um comprimento de onda de 412 nm (BEUTLER, DURON, KELLY, 1963). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mL}$.

4.6.6. Peroxidação de lipídios – TBARS/LPO

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidos no sobrenadante dos homogenatos de hepatopâncreas. Para preparação da amostra o meio contendo alíquota de 0,33 mg/mL de proteína da amostra e ácido tricloroacético (TCA) 6,7% em volume final de 180 μL , foi agitado em vórtex, deixado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm a 4 °C. Após, 40 μL do sobrenadante foi incubado com meio de reação contendo hidroxitoluenobutilado (BHT) 0,007 mg/mL em etanol 95%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 3,1 mg/mL em NaOH 0,3%, TCA 7,9% em PBS, em volume total de 315 μL , durante 60 minutos a 60 °C. Posteriormente, o material foi resfriado e a mensuração do cromóforo rosa foi realizada espectrofotometricamente a 535 nm. Os valores foram expressos em nmol MDA/mg proteína, a partir de curva de calibração preparada com malondialdeído (MDA) nas mesmas condições de análise (FEDERICI et al., 2007).

4.6.7. Determinação de proteína carbonilada

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado na amostra pelo método descrito por Levine et al., (1994). Inicialmente foram adicionados 100 μL do

sobrenadante dos homogenatos de hepatopâncreas em 600 µL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) (0,01M) preparado em solução de HCl 2N, seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação contínua. Após, foi adicionado 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 28 % com agitação seguido de banho de gelo durante 10 min, e centrifugação (5 min a 10.000 xg) e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 min a 10.000 xg), com 800 µL de etanol-acetato de etila (1:1 v/v). Finalmente, o pellet foi ressuscitado com 500 µL de hidrocloreto de guanidina 6,0 M, centrifugado a 9000 xg a 4 °C por 3 min e o sobrenadante transferido para microplaca de 96 poços para leitura a 360 nm. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol/mg proteína.

3.8. Composição centesimal

As amostras de músculo foram retiradas do ultrafreezer para a homogeneização através de um homogeneizador de tecidos, sendo retiradas apenas para a pesagem desejada e devolvidas ao ultrafreezer. Foram realizadas as análises de teor de umidade, cinzas, proteína e lipídeos conforme descrito nos itens 3.3.1 a 3.3.4 da metodologia.

3.9. Análise estatística

Os resultados foram descritos como médias e desvio padrão. Foram realizados testes estatísticos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Bartlett) das amostras. Em casos em que os valores apresentaram distribuição normal, os grupos dos diferentes tratamentos foram avaliados por meio do teste ANOVA-fator único seguido de comparação de médias por teste de Tukey. Na ausência de distribuição normal ou homogeneidade de variâncias das amostras, foi utilizado teste de Kruskal-Wallis, posteriormente o teste de Dunn. Apenas para a análise de composição centesimal do músculo foi utilizado o teste de Duncan. O nível de significância utilizado foi equivalente a 0,05, utilizando programa estatístico (RStudio).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Qualidade da água dos sistemas

Os resultados para qualidade da água de todos os sistemas durante o período experimental estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros da qualidade de água do experimento.

| VARIÁVEIS | MÉDIA ± DESVIO PADRÃO | MÁXIMO | MÍNIMO |
|---|-----------------------|--------|--------|
| Temperatura (°C) | 26,1 ± 1,1 | 30 | 24 |
| Oxigênio Dissolvido (mg/L) | 6,5 ± 0,5 | 8,4 | 5 |
| pH | 6,4 ± 0,9 | 8,1 | 4,8 |
| Amônia (mg/L) | 0,1 ± 0,01 | 0,4 | 0,001 |
| Nitrato (mg/L) | 1,17 ± 0,3 | 1,61 | 0,7 |
| Nitrito (mg/L) | 0,05 ± 0,03 | 0,17 | 0,02 |
| Alcalinidade (mg de CaCO ₃ /L) | 9,4 ± 0,7 | 10,1 | 8,1 |
| Dureza (mg de CaCO ₃ /L) | 15,1 ± 3,9 | 18,9 | 6,3 |

Como pode ser observado na tabela 1, os valores de temperatura e oxigênio dissolvido (OD) mantiveram-se dentro da faixa de conforto para esta espécie, segundo BOYD (2002) de 25 °C a 28 °C para a temperatura e 5 a 7 mg/L para OD. Outros parâmetros de qualidade de água, como pH, amônia, nitrito, nitrato, alcalinidade e dureza se mantiveram dentro dos limites toleráveis para a espécie (BOELTER, 2010). A qualidade de água é crucial para o crescimento e ganho de peso dos camarões assim, o monitoramento contínuo é importante para o desempenho da produção (EMBRAPA, 2007).

4.2. Caracterização das rações

Uma alimentação adequada durante a criação do camarão de água doce proporciona um bom desenvolvimento durante todos os estágios de crescimento, assim a

oferta de proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e outros nutrientes, deve ser o mais completo possível (BARROS; VALENTI, 2003). Com base nisto, foram realizadas análises de composição centesimal das rações a fim de verificar se a adição das diferentes concentrações do extrato de alecrim influenciaria nos níveis de nutrientes necessários aos animais (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição centesimal das rações com as diferentes concentrações de extrato de alecrim.

| VARIÁVEIS | TRATAMENTOS | | | |
|-------------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| | T0 | T1 | T2 | T3 |
| Umidade (%) | 6,28 ± 0,03 | 6,35 ± 0,03 | 6,23 ± 0,08 | 6,40 ± 0,05 |
| Atividade de água | 0,31 ± 0,03 | 0,31 ± 0,02 | 0,31 ± 0,02 | 0,31 ± 0,01 |
| Cinzas (%) | 10,62 ± 0,23 | 10,60 ± 0,14 | 10,50 ± 0,17 | 10,83 ± 0,04 |
| Proteínas (%) | 40,01 ± 0,11 | 38,55 ± 0,001 | 37,60 ± 0,06 | 33,73 ± 0,02 |
| Lipídeos (%) | 9,94 ± 0,16 | 10,85 ± 0,19 | 10,93 ± 0,21 | 10,96 ± 0,20 |
| Carboidratos totais (%) | 33,23 ± 1,41 | 39,41 ± 6,94 | 34,64 ± 0,64 | 37,14 ± 0,22 |
| Fenólicos (mg EAG.g ⁻¹) | 2,60 ± 1,95 | 16,55 ± 2,70* | 27,95 ± 3,11* | 30,82 ± 2,29* |

T0 (sem adição de extrato de alecrim), T1 (2% de adição de extrato de alecrim), T2 (5% de adição de extrato de alecrim) e T3 (15% de adição de extrato de alecrim). Os valores são expressos em médias ± desvio padrão. * estatisticamente diferente do controle (T0) pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade (p<0,05).

As variáveis umidade, atividade de água, cinzas, proteínas e lipídeos não apresentaram diferença estatística em relação às diferentes concentrações de extrato de alecrim indicando que não houve interferência na composição nutricional da ração e prejuízo da oferta dos nutrientes necessários aos animais. Os valores de umidade encontrados nas rações variaram de 6,23 a 6,40%, estando dentro da faixa ótima para esse tipo de produto, que vai de 6 a 13%. Valores abaixo dessa faixa indicam secagem excessiva, podendo causar um decréscimo na qualidade proteica da ração (CUZON, GUILLAUME, 1997) enquanto valores acima de 13% diminuem a vida de prateleira das rações, por facilitar o crescimento de microrganismos (BOELTER, 2010). Para atividade

de água a média das rações foi de 0,31. Celestino (2010) traz que alimentos com valores menores que 0,4 apresentam moléculas de água fortemente ligadas, assim o crescimento de microrganismos e reações químicas e enzimáticas diminuem.

Em relação a quantidade de proteína, os valores se apresentaram entre 33,73 a 40,01%, estando dentro dos valores recomendados por Boelter (2010), onde para os camarões apresentarem índices de crescimento satisfatórios as rações devem conter entre 25 e 60% de proteínas, variando com a fase de crescimento. O teor de lipídeos variou de 9,94 a 10,96% estando próximo do recomendado por Akiyama, Dominy e Lawrence (1991) onde a quantidade de lipídios na ração deve ser de 6 a 7,5%, não devendo ultrapassar os 10%, para não haver redução no crescimento e aumento de mortalidade nos camarões. Também segundo Fitzsimmons (2001) a ração deve apresentar no mínimo 8% de lipídios para um bom desenvolvimento dos animais.

Os valores de compostos fenólicos apresentaram um aumento proporcionalmente ao aumento da porcentagem de extrato de alecrim, apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle. Este resultado já era esperado pois é evidenciado na literatura a presença de compostos fenólicos no alecrim (CUVELIER et al., 2000, DOOLAEGE et al., 2012; HAAK et al., 2009).

4.3. Crescimento e sobrevivência dos animais

Buscando analisar o efeito da suplementação da ração com extrato de alecrim sobre o crescimento dos animais, foram mensurados alguns parâmetros zootécnicos. Como pode ser observado na Tabela 3, a suplementação da ração com extrato de alecrim não influenciou os parâmetros zootécnicos nem a sobrevivência dos animais durante o período experimental.

Tabela 3 - Parâmetros zootécnicos de camarão tratados com suplementação da ração em diferentes concentrações de alecrim.

| | T0 | T1 | T2 | T3 |
|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| TS | 64 ± 3,7 | 68 ± 11,1 | 65 ± 5,1 | 62 ± 3,1 |
| GP | 0,30 ± 0,02 | 0,29 ± 0,01 | 0,27 ± 0,07 | 0,20 ± 0,06 |
| PI | 0,06 ± 0,02 | 0,06 ± 0,02 | 0,06 ± 0,02 | 0,06 ± 0,02 |
| PF | 0,36 ± 0,02 | 0,35 ± 0,01 | 0,33 ± 0,07 | 0,26 ± 0,06 |
| CI | 0,5 ± 0,01 | 0,5 ± 0,01 | 0,5 ± 0,01 | 0,5 ± 0,01 |
| CF | 2,51 ± 0,17 | 2,37 ± 0,19 | 2,28 ± 0,09 | 2,31 ± 0,30 |
| GC | 2,01 ± 0,16 | 1,87 ± 0,19 | 1,78 ± 0,08 | 1,82 ± 0,29 |

Taxa de Sobrevivência em % (TS); Ganho de Peso em g (GP); Peso Inicial em g (PI); Peso Final em g (PF), Comprimento Inicial em cm (CI); Comprimento Final em cm (CF); (GC) Ganho de Comprimento em cm; T0 (Controle, com 0% extrato de alecrim); T1 (Tratamento 1, com 2% extrato de alecrim). T2 (Tratamento 2, com 5% extrato de alecrim); T3 (Tratamento 3, com 15% extrato de alecrim). Os valores são expressos como média ± DP.

Estudos indicam que há uma grande variação em termos de crescimento quando adicionado alecrim às rações de animais aquáticos, em especial peixes, não havendo descrição em crustáceos como o camarão. Este tipo de variação pode ser determinado pela fonte do alecrim, pela espécie de peixe utilizado, idade, sexo e condições experimentais como período de alimentação, temperatura, densidade de estocagem dentre outros fatores (HASSAN et al., 2018; YILMAZ et al., 2012). Ao contrário do observado neste trabalho com os camarões, dietas contendo diferentes níveis de inclusão de alecrim (1 a 3%) promovem o ganho de peso e crescimento de peixes como a carpa comum e em tilápia (HASSAN et al., 2018; YOUSEFI et al., 2019).

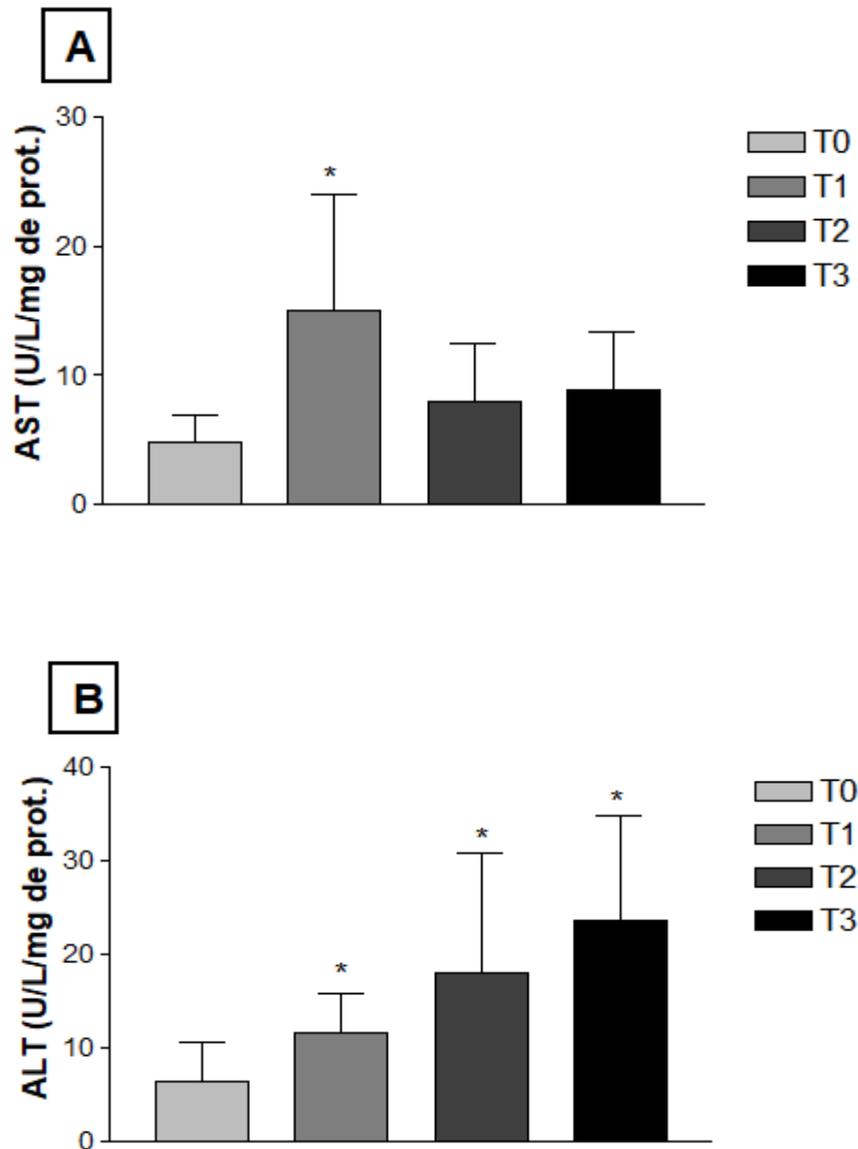
4.4. Análises metabólicas

Com base nos potenciais efeitos reguladores do metabolismo do alecrim e de seus compostos isolados (ANDRADE et al., 2018), este estudo avaliou os efeitos metabólicos da suplementação de diferentes concentrações de extrato de alecrim na ração em camarão *M. rosenbergii* sobre a atividade das aminotransferases, o perfil do sistema de defesa antioxidante e dano oxidativo.

A enzima AST apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento T1 (2% de extrato de alecrim) em comparação com o controle T0. Já a ALT apresentou aumento

significativo da atividade em todos os grupos alimentados com extrato de alecrim, em relação ao controle (T0) conforme a Figura 8 A e B.

Figura 8 - (A) Atividade da enzima AST, (B) Atividade da enzima ALT no hepatopâncreas de camarão suplementados com diferentes concentrações de extrato de alecrim.



T0 (sem adição de extrato de alecrim), T1 (2% de adição de extrato de alecrim), T2 (5% de adição de extrato de alecrim) e T3 (15% de adição de extrato de alecrim). Os valores são expressos em médias \pm desvio padrão. * estatisticamente diferente do controle (T0) pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de probabilidade ($p < 0,05$).

No que se refere ao metabolismo de proteínas, os organismos não possuem reserva de proteína como existe para carboidratos e lipídeos sendo que qualquer quantidade acima das necessidades celulares será metabolizada e eliminada. No entanto, nas células existe o que se chama de *pool* de aminoácidos, que consiste em um conjunto de aminoácidos livres em estado de equilíbrio dinâmico, oriundos do processo denominado *turnover* proteico (processo de renovação proteica celular envolvendo a degradação e síntese de proteínas da dieta ou corporais). Esse pool tem como objetivo básico satisfazer a demanda de aminoácidos nas várias células e tecidos do organismo, sendo o fígado o principal órgão responsável por esse equilíbrio (ANGELIS; TIRAPEGUI, 2007). O metabolismo de aminoácidos ocorre em praticamente todos os tecidos com destaque para fígado e músculo esquelético. O passo inicial do metabolismo dos aminoácidos envolve a transferência do grupo amino da cadeia carbonada para um α -cetoácido aceptor, sendo essa reação de transaminação catalisada pelas aminotransferases (ou transaminases). Esta reação pode ser utilizada tanto para o processo de catabolismo quanto para a biossíntese de aminoácidos (NELSON; COX, 2014).

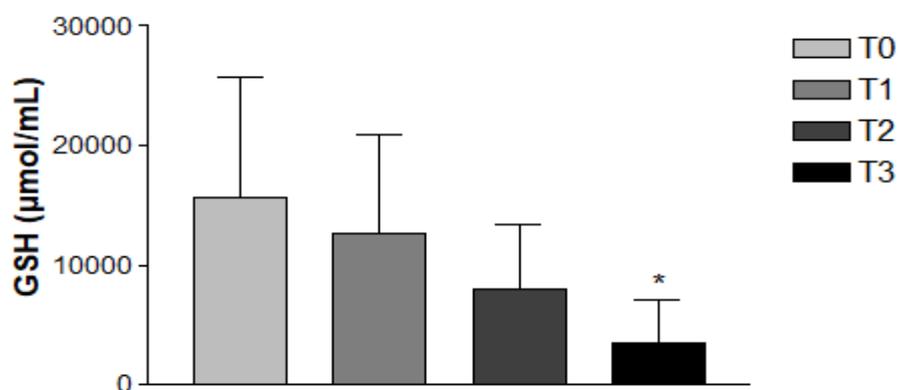
A atuação dessas enzimas (AST e ALT) nos tecidos está diretamente relacionada à síntese e degradação de aminoácidos e conseqüentemente sua disponibilidade para a síntese de proteínas. A disponibilidade de aminoácidos e proteínas é extremamente importante durante o crescimento dos animais, pois o ganho de massa muscular é diretamente proporcional ao aumento do conteúdo de proteína presente no músculo esquelético. Apesar da atividade das enzimas hepáticas AST e ALT sofrerem alterações com a suplementação de extrato de alecrim, esse aumento da atividade parece não estar relacionado ao ganho de peso e crescimento dos animais mas sim ao uso dos aminoácidos como fonte de energia ou para síntese e armazenamento de lipídeos ou carboidratos (NELSON; COX, 2014) uma vez que não houve variação significativa dos parâmetros zootécnicos durante o período experimental. Por outro lado, as concentrações do extrato de alecrim podem ter induzido uma condição de estresse aos animais, mobilizando a liberação de cortisol e aumento da gliconeogênese hepática com o objetivo de fornecer glicose para a corrente sanguínea e preparar o animal para resposta de defesa (TAVARES-DIAS, et al., 2001; URBINATI, CARNEIRO, 2004; BARCELLOS et al.,

2001). Desta forma o aumento de atividade das enzimas AST e ALT no hepatopâncreas poderia estar relacionada a uma tentativa de adaptação metabólica frente ao extrato de alecrim. Zoral et al., (2018) indicou que diferentes doses de extrato de alecrim adicionadas à ração de carpas provocaram aumento de atividade de AST hepática bem como causaram alterações histopatológicas no fígado das carpas de forma dose-dependente sugerindo que altas doses de extrato aquoso de alecrim nas dietas podem apresentar efeitos de toxicidade aos animais.

É evidenciado que as condições de cultivo influenciam no equilíbrio fisiológico dos animais e qualquer condição que altere a sua homeostasia pode provocar um aumento da produção de espécies reativas que levam ao processo de estresse oxidativo celular danificando membranas, proteínas e DNA e podem levar à morte das células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A fim de avaliar se a suplementação com extrato de alecrim na ração influenciou no sistema de defesa antioxidante dos camarões, foram avaliadas as atividades das enzimas glutathione redutase (GR), glutathione S-transferase (GST), o conteúdo de glutathione reduzida (GSH), a peroxidação lipídica (LPO) e a carbonilação de proteínas (PC).

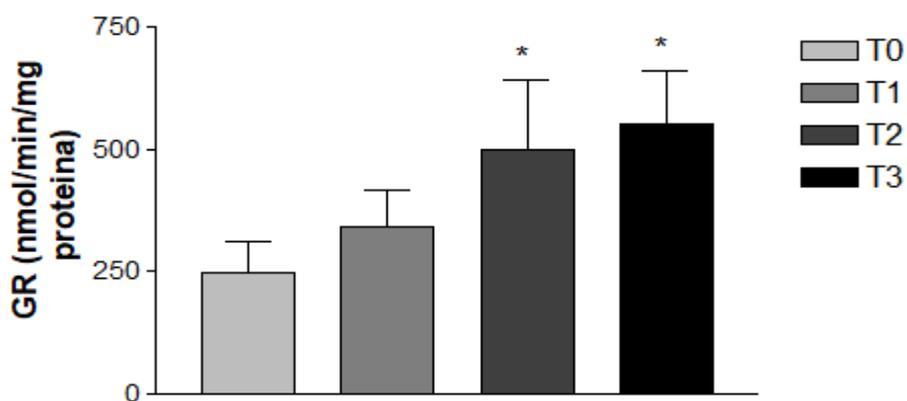
As figuras 9, 10 e 11 apresentam os resultados referentes à GSH, GR e GST respectivamente. Como pode ser observado nas figuras, os tratamentos com extrato de alecrim promoveram uma redução dos níveis de GSH hepáticos, sendo que a diferença significativa foi observada para a concentração mais elevada de extrato (15%) em relação ao grupo controle (Figura 9). Ainda, ocorreram aumentos significativos da atividade da GR para os grupos T2 (5%) e T3 (15%) e também a atividade da GST apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle para todas as concentrações de extrato de alecrim testadas.

Figura 9 - Concentração de Glutathiona reduzida (GSH) em hepatopâncreas de camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim.



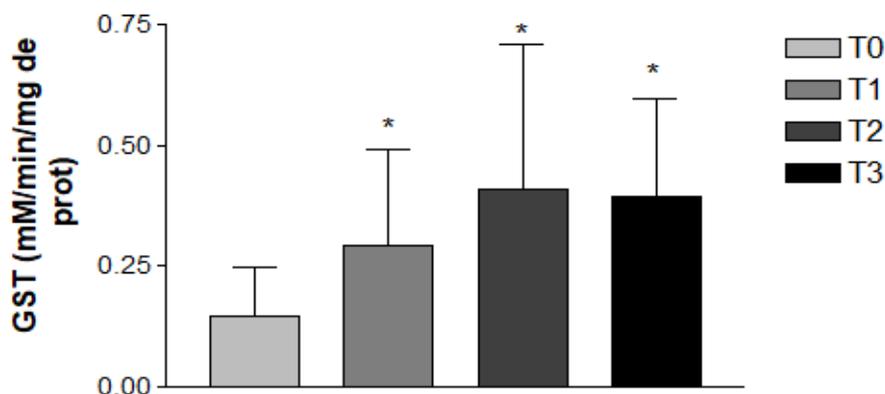
T0 (sem adição de extrato de alecrim), T1 (2% de adição de extrato de alecrim), T2 (5% de adição de extrato de alecrim) e T3 (15% de adição de extrato de alecrim). Os valores são expressos em médias \pm desvio padrão. * estatisticamente diferente do controle (T0) pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de probabilidade ($p < 0,05$).

Figura 10 - Atividade da enzima Glutathiona redutase (GR) em hepatopâncreas de camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim.



T0 (sem adição de extrato de alecrim), T1 (2% de adição de extrato de alecrim), T2 (5% de adição de extrato de alecrim) e T3 (15% de adição de extrato de alecrim). Os valores são expressos em médias \pm desvio padrão. * estatisticamente diferente do controle (T0) pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de probabilidade ($p < 0,05$).

Figura 11 - Atividade da enzima Glutationa S-Transferase (GST) em hepatopâncreas de camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim.



T0 (sem adição de extrato de alecrim), T1 (2% de adição de extrato de alecrim), T2 (5% de adição de extrato de alecrim) e T3 (15% de adição de extrato de alecrim). Os valores são expressos em médias \pm desvio padrão. * estatisticamente diferente do controle (T0) pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de probabilidade ($p < 0,05$).

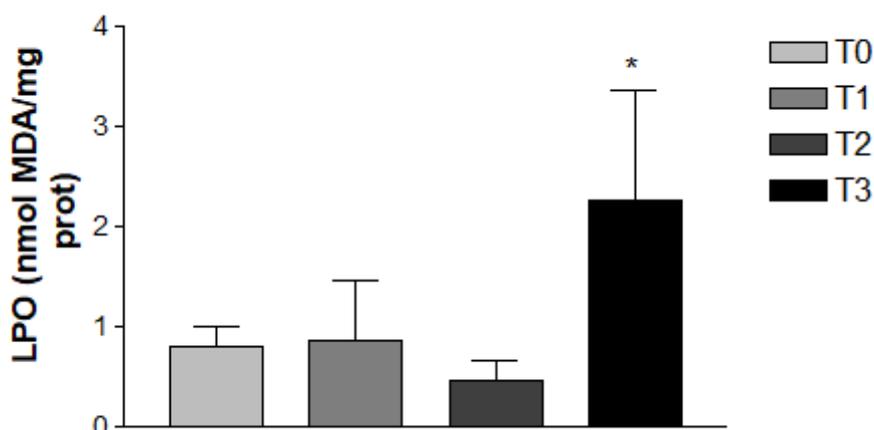
A glutatona (GSH) atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a proteção celular contra a geração de espécies reativas. Durante uma situação de estresse oxidativo, a GSH transfere elétrons ou liga-se diretamente às espécies reativas neutralizando as mesmas e passando para o estado oxidado (GSSG) (HALL, MALIA, 1986). Parte deste processo pode ser catalisado enzimaticamente pela glutatona peroxidase (GPx). Para garantir a disponibilidade de GSH na célula, a ação da enzima glutatona redutase (GR) é extremamente importante. Ela atua no processo de redução da GSSG, utilizando elétrons do NADPH regenerando a glutatona à sua forma reduzida (GSH) (ROVER JUNIOR et al., 2001). Além do ciclo redox, a glutatona também exerce papel importante na destoxificação de substâncias químicas pois participa do processo de conjugação catalisado pela glutatona S-transferase formando substâncias de baixa toxicidade (HUBER, et al., 2008). Assim essa conjugação é importante, uma vez que esses compostos xenobióticos são potencialmente tóxicos, podendo danificar proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, provocando lesão celular, mutações genéticas e peroxidação lipídica (BERTINI et al., 2003).

Os resultados do presente estudo apresentaram uma redução na concentração de GSH em proporção ao aumento da concentração de extrato na dieta dos camarões, acompanhado de aumentos de atividade da GR e GST. Estes resultados sugerem que o alecrim acelerou as reações de biotransformação hepática via GST consumindo a GSH disponível. Ainda, o alecrim pode ter apresentado um efeito pró-oxidante (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016) ativando vias metabólicas produtoras de espécies reativas (induzindo uma condição de estresse oxidativo) e consumindo GSH enquanto um aumento de atividade de GR foi observado na tentativa de reequilibrar os níveis de GSH/GSSG e o status antioxidante da célula.

Os polifenóis receberam atenção específica nas últimas décadas por causa de seu papel em uma variedade de propriedades biológicas, incluindo antioxidante, quelação de metais, eliminação de radicais livres, modulação enzimática e atividades anticancerígenas (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016). Porém vários relatos mostram que os antioxidantes fenólicos podem agir como pró-oxidantes sob certas condições, incluindo altas concentrações de íons de metais de transição, pH alcalino e a presença de moléculas de oxigênio (BLOKHINA et al., 2003). É assumido que essa atividade pró-oxidante pode induzir peroxidação lipídica, dano ao DNA e apoptose em células normais (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

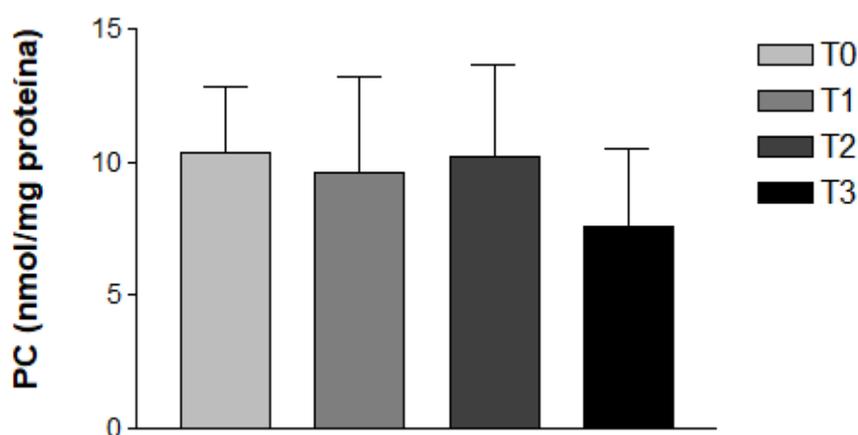
Para mensuração do dano oxidativo ocorrido nas células utilizam-se produtos resultantes do processo de oxidação (PINER, UNER, 2013) mensurando-se o dano oxidativo através da lipoperoxidação (LPO) e dos níveis de proteína carbonilada (PC). A figura 12 apresenta os níveis de peroxidação lipídica após o período de suplementação com extrato de alecrim na ração, sendo que foi observado um aumento significativo de peroxidação no tratamento T3 (15% de extrato de alecrim). Em relação a concentração de proteína carbonilada, não foram observadas alterações significativas entre as diferentes concentrações do extrato utilizadas (Figura 13).

Figura 12 – Níveis de Lipoperoxidação (LPO) em hepatopâncreas dos camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim.



T0 (sem adição de extrato de alecrim), T1 (2% de adição de extrato de alecrim), T2 (5% de adição de extrato de alecrim) e T3 (15% de adição de extrato de alecrim). Os valores são expressos em médias \pm desvio padrão. * estatisticamente diferente do controle (T0) pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de probabilidade ($p < 0,05$).

Figura 13 - Níveis de Proteína Carbonilada – PC em hepatopâncreas dos camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim.



T0 (sem adição de extrato de alecrim), T1 (2% de adição de extrato de alecrim), T2 (5% de adição de extrato de alecrim) e T3 (15% de adição de extrato de alecrim). Os valores são expressos em médias \pm desvio padrão.

A peroxidação lipídica é um fenômeno que começa normalmente com a extração de um átomo de hidrogênio de uma cadeia poli-insaturada de um lipídeo, por intermédio da ação de uma espécie reativa que abstrai elétrons das ligações duplas formando espécies radicalares que buscam elétrons dos lipídeos vizinhos propagando a peroxidação ao longo das membranas (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2015). O aumento de peroxidação lipídica observado no tratamento com maior concentração do extrato de alecrim indica que esta planta ou algum de seus componentes específicos induziu um aumento de produção de espécies reativas alterando o estado redox das células e desencadeando aumento no ataque aos ácidos graxos de membrana. Este efeito é corroborado pelos resultados relativos à GSH e GR (Figura 9 e 10).

É comum que moléculas antioxidantes possam apresentar efeitos pró-oxidantes em especial na presença de metais, como por exemplo a vitamina C e compostos fenólicos. Isso acontece quando estas moléculas se combinam com íons como ferro e cobre reduzindo Fe^{3+} para Fe^{2+} ou Cu^{3+} para Cu^{2+} e facilitam a ocorrência de reação de Fenton/Haber-Weiss (DUARTE; LUNEC, 2005). O α -tocoferol também é conhecido por ser um antioxidante útil e poderoso, mas em altas concentrações ele também pode se tornar um pró-oxidante, pois quando reage com um radical livre, torna-se um radical em si, e se não houver ácido ascórbico suficiente para a sua regeneração o mesmo permanecerá nesse estado altamente reativo e promoverá oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (CILLARD et al., 1980).

Segundo dados da literatura, o extrato de alecrim apresenta potencial atividade como modulador metabólico e agente antioxidante (ANDRADE et al., 2018). Nos resultados deste trabalho foi possível verificar que o uso do extrato de alecrim influenciou no metabolismo de aminoácidos, provavelmente aumentando sua utilização como fonte de energia ou como fonte de precursores para síntese e armazenamento de lipídeos ou carboidratos. Além disso, concentrações mais altas do extrato apresentaram efeitos pró-oxidantes como evidenciado pelas modificações do sistema de defesa antioxidante e marcador de dano oxidativo à membranas. Diante disto, é possível que o extrato de alecrim induza modificações metabólicas nas células que levem a um aumento na geração

de espécies reativas e conseqüentemente a um desequilíbrio do status antioxidante podendo causar prejuízo ao funcionamento celular.

4.5. Análise centesimal da carne do camarão

A composição centesimal exprime basicamente a proporção dos nutrientes em um alimento para poder obter o valor nutricional do mesmo e suas características físico-químicas. Como pode ser observado na Tabela 4, a suplementação da ração com as diferentes concentrações de extrato de alecrim não promoveu alterações significativas nos parâmetros avaliados com exceção do conteúdo de lipídeos. Este parâmetro apresentou redução significativa em todos os grupos experimentais quando comparado ao grupo controle.

Tabela 4 - Composição centesimal da carne dos camarões alimentados com diferentes concentrações de extrato de alecrim.

| VARIÁVEIS | TRATAMENTOS | | | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | T0 | T1 | T2 | T3 |
| Umidade (%) | 80,51 ± 0,33 | 80,48 ± 0,62 | 80,87 ± 0,87 | 81,45 ± 0,82 |
| Cinzas (%) | 10,62 ± 0,23 | 10,60 ± 0,14 | 10,50 ± 0,17 | 10,83 ± 0,04 |
| Proteínas (%) | 16,88 ± 1,07 | 16,9 ± 0,91 | 15,90 ± 1,33 | 16,26 ± 0,66 |
| Lipídeos (%) | 1,99 ± 0,51 | 1,28 ± 0,31* | 1,30 ± 0,12* | 1,57 ± 0,45* |

T0 (sem adição de extrato de alecrim), T1 (2% de adição de extrato de alecrim), T2 (5% de adição de extrato de alecrim) e T3 (15% de adição de extrato de alecrim). Os valores são expressos em médias ± desvio padrão. * estatisticamente diferente do controle (T0) pelo teste de Duncan ao nível de probabilidade ($p < 0,05$).

A composição centesimal da carne do camarão é um dos grandes atrativos deste produto ao mercado consumidor devido a ser boa fonte de proteínas e lipídeos, principalmente ácidos graxos poli-insaturados além de vitaminas e minerais (MOREIRA et al., 2001; FURUYA et al., 2006). No entanto, teores de umidade elevados e alta atividade de água e pH próximo da neutralidade da carne destes animais os tornam altamente perecíveis. Devido a isso, podem ocorrer alterações bioquímicas como a oxidação de lipídeos, a ação de enzimas autolíticas e a atividade metabólica de

microrganismos presentes no pescado que resultam em mudanças de sabor, odor e maciez do produto (SIVERTSVIK et al., 2002; FURLAN; TORRES, 2010). Diante disto, o uso de aditivos, seja na dieta ou durante os procedimentos pós-despesca, que melhorem a condição fisiológica dos animais têm grande potencial de aplicação e papel importante na qualidade do produto final.

Alguns estudos têm demonstrado que o uso de aditivos, como por exemplo produtos naturais, na dieta de organismos aquáticos pode influenciar a composição corporal e desta forma o produto final ofertado ao consumidor (SANTOS et al., 2009). O trabalho de Pinto et al. (2001) com aplicação de compostos fenólicos (principalmente taninos) na dieta de peixes piaçuçus demonstrou um efeito de redução dose-dependente do conteúdo lipídico corporal ao final do período experimental. Além disso, também foi observado uma redução do crescimento dos animais com o aumento das concentrações de taninos na dieta. Resultados semelhantes também foram observados por Aiura (2007) com o uso do extrato de alecrim em tilápias onde, após o período experimental, o teor de lipídios dos filés foi alterado significativamente, sendo que os grupos que receberam extrato de alecrim apresentaram menores teores lipídicos.

Como destacado na tabela 4, a adição do extrato de alecrim neste trabalho promoveu redução do conteúdo de lipídeos totais, sem influenciar no conteúdo de proteínas ou outros parâmetros da composição centesimal, resultado similar aos trabalhos de Pinto et al. (2001) e Aiura (2007). Além disso, este resultado também está correlacionado às mudanças fisiológicas observadas nos animais, como as alterações do sistema de defesa antioxidante e aumento da peroxidação lipídica após os tratamentos com o extrato de alecrim indicando uma condição de estresse oxidativo. O método de determinação a frio Bligh & Dyer (1959) refere-se a extração e purificação de lipídeos totais. Assim, vale destacar que essa metodologia não detecta os produtos de peroxidação lipídica (BRUM, et al., 2009). Desta forma, a redução do teor de lipídeos observada nos grupos experimentais pode estar relacionada ao maior grau de peroxidação ou ainda a uma tentativa de adaptação e resposta metabólica do organismo à condição de estresse oxidativo. Assim, diante dos resultados apresentados pode-se sugerir que o extrato de

alecrim adicionado à ração apresenta um potencial efeito pró-oxidante promovendo alterações fisiológicas significativas que refletiram na composição da carne do camarão.

5. CONCLUSÕES

Em relação aos resultados encontrados neste estudo pode-se concluir que:

O uso do extrato de alecrim na ração de camarões não atuou como indutor de crescimento dos animais durante o período experimental.

O uso do extrato de alecrim na ração influenciou a atividade das enzimas do metabolismo de aminoácidos, indicando um efeito regulador metabólico provavelmente direcionando o uso de aminoácidos como fonte de energia uma vez que não foram observadas alterações de ganho de peso e conteúdo de proteína corporal.

A suplementação com alecrim promoveu alterações no sistema de defesa antioxidante, indicando o estabelecimento de uma condição de estresse oxidativo com depleção de GSH, aumento de peroxidação lipídica e atividade de GR e GST.

Em termos de composição centesimal, o uso do extrato de alecrim promoveu redução do conteúdo total de lipídeos da carne do camarão.

Os resultados encontrados após a adição de extrato de alecrim na dieta e o tratamento *in vivo* indicam um potencial pró-oxidante do extrato de alecrim considerando as alterações do sistema de defesa antioxidante e de composição corporal observados. A partir do exposto torna-se necessário mais estudos com diferentes doses/períodos de suplementação em camarões para se determinar o real potencial antioxidante e/ou pró-oxidante do alecrim.

6. REFERÊNCIAS

AIURA, F.S. **Ação do extrato de alecrim e fontes de óleo na qualidade de filés de tilápia do Nilo**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal - São Paulo, 2007.

AKIYAMA, D. M.; DOMINY, W. G.; LAWRENCE, U. L. Penaeid shrimp nutrition of the commercial feed industry: revised. In: AKIYAMA, D. M.; TAN, R. K. H. (Eds). **Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop**, Tailândia e Indonésia, American Soybean Association, Cingapura, p. 80-98, 1991.

AL-JAMAL, A.R.; ALQADI, T. Effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on lipid profile of diabetic rats. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v.4, p.199–204, 2011.

ALMEIDA-DORIA, R. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, p.01-14, 2000.

ANDRADE, J.M.; et al. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future Science**, v.4, 2018.

ANGELIS, R. C.; TIRAPEGUI, J. **Fisiologia da nutrição humana. Aspectos básicos, aplicados e funcionais**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2007. 565p.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, And Signal Transduction. **Annual Reviews of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington, 1995. v.2, 474p.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.141-155, 1997.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoi & Gaimard), a South American Catfish. **Aquaculture**, v.32, p.121-123, 2001.

BARREIROS, A.L.B.; DAVID, G.M. Estresse oxidativo: Reação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.

BARROS, H.P.; VALENTI, W.C. Ingestion rates of *Artemia nauolii* for different larval stages of *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v.217, n.1-4, p.223-233, 2003.

BERTINI, E., et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v.333, p.19-36, 2003.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.163, n.61, p. 882-90, 1963.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, n.91, p.179-194, 2003.

BOELTER, J.R. **Obtenção, caracterização e utilização de silagem de resíduos de sardinha na formulação de rações para camarão**. João Pessoa, PB, 2010, 84 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2010.

BOYD, C. E. Parâmetros da qualidade de água: oxigênio dissolvido. **Revista da ABCC**, Recife, v.4, p.66-69, 2002.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Total lipid, cholesterol, and fatty acids of farmed freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and wild marine shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*); **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, p.359-369, 2001.

BROWN, K.E; et al. Nlcam modulates midline convergence during anterior neural plate morphogenesis. **Developmental Biology**. v.339, p.14-25, 2010.

BRUM, A.A.S.; ARRUDA, L.F.; REGITANO-D´ARCE, M.A.B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v.32, n.4, p.849-854, 2009.

BUCIC-KOJIC, A.; et al. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grapes seeds. **Journal of Food Engineering**, v.81, n.1, p.236-242, 2007.

CAMPBELL, T.W. Bioquímica Clínica dos Peixes e Anfíbios, In: THRALL, A., T., et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. **Glutathione Reductase**. Methods in Enzymology, v.113, 1985.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15-25, 2013.

CELESTINO, S.M.C. **Princípios de secagem de alimentos**. Planaltina, DF, Embrapa Cerrados, 2010.

CILLARD, J.; et al. a-Tocopherol prooxidants effect in aqueous media: increased autoxidation rate of linoleic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.57, p.252–255, 1980.

CUI, L.; et al. Abietane diterpenoids of *Rosmarinus officinalis* and their diacylglycerol acyltransferase-inhibitory activity. **Food Chemistry**, v.132, p.1775–1780, 2012.

CUVELIER, M.E.; BONDETY, V.; BERSET, C. Behavior of phenolic antioxidants in a portioned medium: Structure-activity relation-ship. **Journal of the American oil Chemists' Society**, v.77, p.819-823, 2000.

CUZON, G.; et al. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, Amsterdã, v.235, p.513-551, 2004.

CUZON, G.; GUILLAUME, J. Energy and protein: energy rates. **World Aquaculture Society**, v.6, p.51-70, 1997.

D'ABRAMO, L.R.; et al. M. **Production and marketing strategies for *Macrobrachium rosenbergii*, in the USA**. In Anais do IV Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de Camarões e I Congresso Brasileiro de Aquicultura, João Pessoa, p. 950, 1993.

DEL BAÑO, M.J.; et al. Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.15, p.4247-4253, 2003.

DOOLAEGE, E. H.; et al. Effect of rosemary extract dose on lipid oxidation, colour stability and antioxidant concentrations, in reduced nitrite liver pâtés. **Meat Science**, v.90, p.925-931, 2012.

DUARTE, T.L.; LUNEC, J. Review: when is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. **Free Radical Research**. v.39, p.671–686, 2005.

EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. **Phytotherapy Research**, v.30, p.1379–1391, 2016.

ELIAS, J.R.; KELLERBY, S.S.; DECKER, E.A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.48, n.5, p.430-441, 2008.

EMBRAPA. **Boas Práticas de Manejo (BPMs) para Reduzir o Acúmulo de Amônia em Viveiros de Aquicultura**. 2007.

FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018**. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma, 2018.

FEDERICI, G.; SHAW B.J.; HANDY R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v.84, n.4, p.415-30, 2007.

FITZSIMMONS, K. Polyculture of tilapia and penaeid shrimp. **Global Aquaculture Advocate**, v.4, n.3, p.43-44, 2001.

FURLAN, E.F.; TORRES, E.A.F.S. **Segurança alimentar na cadeia produtiva do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*)**. In: Simpósio de Ciência e tecnologia de alimentos. Aracaju, Sergipe, 2010.

FURUYA, W.M.; et al. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos do camarão-d'água-doce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1577-1580, 2006.

GANDRA, E.A; et al. Potencial antimicrobiano e antioxidante de extratos vegetais de alecrim, erva doce, estragão e orégano. **Revista Ciência e Tecnologia**. v.15, n.20, 2013.

GAYA, M.; et al. Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPARc pathways at the onset of the differentiation program. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, p.3796–3806, 2013.

GIBSON, R.; BARKER, P. L. The decapod hepatopancreas. **Oceanography Marine Biology: an annual review**, v.17, p.285-346, 1979.

GONZÁLES, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução a Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ed. Porto Alegre: UFRGS, 2006.

HAAK, L.; RAES, K.; SMET, S. D. Effect of plant phenolics, tocopherol and ascorbic acid on oxidative stability of pork patties. **Journal of Science**, v.89, p.1360-1365, 2009.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, 1974.

HALL, R.; MALIA, R.G.; **Medical Laboratory Hematology**, London: Butterworths, 1986; p 294.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5 ed. Oxford University Press, New York, 2015.

HASSAN, A.A.M.; et al. Effects of Some Herbal Plant Supplements on Growth Performance and the Immune Response in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). **International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture"**, v.1, p.134–141, 2018.

HELDT, A; et al. **Curso de extensão carcinicultura de água doce cartilha básica**. Universidade Federal do Paraná – UFPR – Campus Palotina, 2012.

HERNÁNDEZ, A.; et al. Preliminary insights into the incorporation of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis L.*) in fish feed: influence on performance and physiology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Fish Physiology Biochemistry**, v.41, p.1065–1074, 2015.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1170-1179, 2008.

ICELY J.D.; NOTT J.Á. **Digestion and absorption: digestive system and associated organs**. In: Harrison FW, Humes AG (eds) Microscopic anatomy of the invertebrates. Decapod Crustacea. Wiley, New York, v.10, p.147-201, 1992.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 5^o ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JURS, K.; BASTROP, R. Amino acid metabolism in fish. **Biochemistry and molecular biology of fishes**, p.159-189, 1995.

LEE, K.W., LEE, H.J. Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.127, p.424-431. 2006.

LEMOES, D.; EZQUERRA, J.M.; GARCIA-CARREÑO, F.L. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. **Aquaculture**, v.186, p.89-105, 2000.

LEVINE R. L.; et al. Assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v.233, 1994.

LIMON-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**. v.674, p.137-147, 2009.

LIN, C. C.; LIANG, J. H. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. **Journal of Food Science**. v.67, p.530-533, 2002.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1998. 220p

MAY, A; et al. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.12, n.2, p.195-200, 2010.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E., A. Glutathione. **Review of Biochemistry**, v.52, p.711-760, 1983.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEW, M. B.; et al. **Freshwater prawns: Biology and Farming**. 1. ed. Oxford: Wiley-blackwell, 2010, 560p.

NEW, M. B.; VALENTI, W. C. **Freshwater Prawn Culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii***, Oxford, Blackwell Science. 443p, 2000.

NUNES, A.J.P.; SÁ, M.V.C. Na busca por um máximo crescimento e eficiência em rações para o cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*. **Revista da ABCC**, ano XII, n.1, p.24- 31, 2010.

PASTORE, A; et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v.333, n1, p.19-39, 2003.

PICOLO, J.M. **Estrutura funcional do hepatopâncreas no processo digestivo em *Macrobrachium amazonicum***. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, 2013.

PINER, P.; UNER, N. Oxidative stress and apoptosis was induced by bio-insecticide spinosadin the liver of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.36, p.956–963, 2013.

PINTO, L.G.Q.; et al. Desempenho do Piauí (*Leporinus macrocephalus*) Arraçoado com dietas contendo diferentes teores de tanino. **Revista brasileira de zootecologia**, v.30, n.4, p.1164-1171, 2001.

RIBEIRO, S.M.R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v.21, n.3, p.133-149, 2005

ROVER JUNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

SAMARANAYAKA, A.G.P.; LI-CHAN, E.C.Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of functional foods**. v.3, p.229 –254. 2011.

SANT'ANA, L.S.; MANCIN-FILHO, J. Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets. **Food Chemistry**, v.68, p.175-178, 1999.

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

SCHIRCH, D.T.; MANCINI-FILHO, J. **Avaliação da atividade antioxidante em extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*, L.)**. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XVII. Fortaleza. Resumos. Fortaleza: SBCTA, 2000. v.2, p.5.15.

SEABRA, M.E. **Cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em sistema multifásico**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SIMÕES, C., M., O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, 1102p.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, W.; ROSNES, T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fisherie products – significance of microbial growth, activies and safety. **International Journal of Food Science and Technology**. n.37, 2002.

Standart of Methods for the Examination of Water and Wasterwater (APHA). **American Public Health Association**, 19 ed. Washington, 1995.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil Protozoários. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, p.67-79, 2001.

TEKMAN, B.; et al. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.148, n.2, p.117-121, 2008.

TOYAMA, M.H. **Metabolismo energético do camarão da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Biologia geral e aplicada) - Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, São Paulo, 69f, 2013.

TUDEK, B.; et al. Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. **American Journal of Translational Research**, v.2, p. 254–284. 2010.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C., F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSI, D.M.;

CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p.171-193, 2004.

VALENTI, W. C. **A modernização da carcinicultura de água doce**. Revista da Associação Brasileira dos Criadores de Camarões. Ano III, nº 1, abril de 2001. p.56-58. 2001.

VALENTI, W. C. **Aquicultura sustentável**. In: Congresso de Zootecnia, 12o, Vila Real, Portugal, Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais. p.111-118. 2002a.

VALENTI, W. C. **Criação de camarões de água doce**. In: Congresso de Zootecnia, 12o, Vila Real, Portugal, 2002, Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais. p.229-237, 2002.

YILMAZ S.; ERGÜN S.; ÇELİK E.Ş. Effects of herbal supplements on growth performance of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Change in body composition and some blood parameters. **Journal of Bioscience and Biotechnology**, v.1, n.3, p.217-222, 2012.

YILMAZ S.; ERGUN S.; SOYTAŞ N. Herbal supplements: useful tools for preventing streptococcal disease during first-feeding of tilapia fry, *Oreochromis mossambicus*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v.65, n.65, p.833, 2013.

YOUSEFI, M.; et al., Rosemary leaf powder improved growth performance, immune and antioxidant parameters, and crowding stress responses in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings, **Aquaculture**, v.505, p.473-480, 2019.

ZIECH, D.; et al. Reactive Oxygen Species (ROS)—Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. **Mutation Research**. v.711, p.167–173. 2011.

ZORAL, M.A.; et al. Toxicological effects and pharmacokinetics of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract in common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v.495, n.1, p.955-960, 2018.

7. ANEXOS



LAUDO DE ANÁLISE

E-mail: farindustria@floraervas.com.br

Website: www.floraervas.com.br

Rua Ozório Strapasson, 180 – Centro Industrial Mauá – Colombo – PR – BR

Fone/Fax: 55 (41)3675-1556 CNPJ 00.173.841/0002-81

Licença Sanitária n°1144/2016

| | |
|--|---|
| PRODUTO: ALECRIM ROSMARINUS SINONIMIAS: ALECRIM PORTUGUÊS FAMILIA: LABIATAE PARTE UTILIZADA: FOLHAS PAIS DE ORIGEM: MARROCOS | NOME ESPECÍFICO: <i>Rosmarinus officinalis</i> LOTE: ALEP637 FABRICAÇÃO: 20/ 11/2017 VALIDADE: 20/11/2019 DESCONTAMINAÇÃO/MÉTODO: Fumigação |
|--|---|

Aspectos Macroscópicos: Folhas inteiras sésseis, lineares, coriáceas, margens levemente recurvadas, de coloração verde acinzentado; gabras na face superior e coberta por pêlos estelares na face inferior.

FÍSICO-QUÍMICO

| | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Cor: Esverdeado | Materiais estranhos: NÃO ENCONTRADO |
| Odor: Característico | pH: N.R. |
| Sabor: levemente amargo | Umidade: N.R. |
| Textura: CARACTERÍSTICO | Cinzas Totais: N.R. |
| Peso da Amostra: 100 g | Cinzas Insolúveis: N.R. |

| Ensaio realizado | Resultados | Metodologia |
|------------------|--|-------------|
| Microscopia | Ausência de fragmentos de insetos Ausência de larvas e parasitas Ausência de pêlos de roedores Ausência de sujidades em geral | AOAC 950.86 |

Os resultados das análises acima foram aprovados com base nas seguintes referências: British Herbal Pharmacopoeia 1996, pág. 162; Metodologia interna e F. Brás. IV Ed, 1988, 4.2.3.

Abreviaturas utilizadas: NR= não realizado; NA= não se aplica; ND= não detectado.

Poderá ocorrer variação na cor/textura/odor do produto de lotes diferentes por se tratar de produto natural.

Nossas amostragens estão de acordo com a normativa ABNT/NBR - Norma de amostragem - 5426.

Para garantir a qualidade e validade desse insumo, armazenar em local seco e arejado, evitando o calor e a umidade. Manter na embalagem original.

Clécio Zenni Filho
Farmacêutico Industrial
CRF-9 n.3876