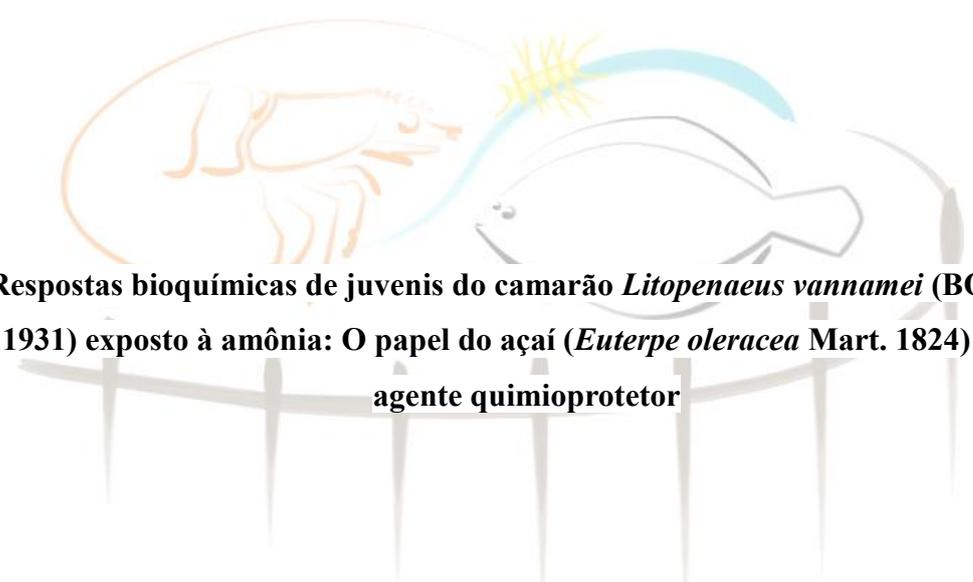




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA (IO)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

A faint, stylized illustration in the background shows a shrimp on the left and a fish on the right, both in a light orange/brown color. A yellow sun with rays is positioned between them, and a blue arc above the fish suggests a water surface or a protective layer. The entire illustration is semi-transparent and serves as a decorative backdrop for the title.

Respostas bioquímicas de juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) exposto à amônia: O papel do açaí (*Euterpe oleracea* Mart. 1824) como agente quimioprotetor

GRECICA MARIANA COLOMBO

FURG
RIO GRANDE-RS
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Avaliação de defesas antioxidantes e de dano oxidativo em juvenis do camarão
Litopenaeus vannamei (BOONE, 1931) exposto à amônia: O papel do açaí (*Euterpe
oleracea* Mart. 1824) como agente quimioprotetor**

GRECICA MARIANA COLOMBO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. José María Monserrat

Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Junior

RIO GRANDE-RS

Fevereiro de 2019

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS.....	7
Geral.....	7
Específicos.....	7
REFERÊNCIAS.....	8
CAPÍTULO 1	14
Respostas bioquímicas de juvenis do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931) exposto à amônia: O papel do açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart. 1824) como agente quimioprotetor	15
Resumo.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Local e instalações.....	19
2.2. Material biológico e desenho experimental	19
2.3. Análise da qualidade da água	20
2.4. Preparo das rações.....	20
2.5. Análises proximal da ração e do músculo do camarão.....	21
2.6. Avaliação do desempenho zootécnico	22
2.7. Análises bioquímicas.....	22
2.7.1. Homogeneização das amostras.....	22
2.7.2. Polifenóis e flavonóides	22
2.7.3. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)	23
2.7.4. Peroxidação lipídica (TBARS)	23
2.7.5. Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)	24
2.7.6. Grupos sulfidrilas associados à proteínas (P-SH)	24
2.7.7. Determinação da atividade da glutathiona-S-transferase (GST).....	25
2.8. Análise estatística	25

3. RESULTADOS	25
3.1. Qualidade de água	25
3.2. Desempenho zootécnico e composição proximal	26
3.3. Análises Bioquímicas	27
3.3.1. Polifenóis e Flavonóides	27
3.3.2. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)	27
3.3.3. Concentração da glutathiona reduzida (GSH)	30
3.3.4. Atividade da glutathiona- S- transferase (GST)	31
3.3.5. Concentração de grupos sulfidrila associados à proteína (P-SH) .	33
3.3.6. Concentração de lipídios peroxidados (TBARS).....	35
4. DISCUSSÃO.....	36
5. CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	43

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à Deus, pois foi Ele quem abriu essa porta e me sustentou com sua infinita graça e misericórdia durante esse período. Aos meus queridos pais Luiz Colombo e Veranice Colombo e ao meu irmão Gabriel Colombo, os quais amo muito. A todos os meus familiares e amigos pelo amor e incentivo em meio a essa caminhada.

“Eu sei das tuas obras, eis que diante de ti pus uma porta aberta e ninguém pode fechar; tendo pouca força, guardaste a minha palavra, e não negaste o meu nome”. (Apocalipse 3:8)

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à Deus, por ter me dado a oportunidade de cursar esse mestrado, por ter me sustentado e cuidado de mim.

A minha família, pelo incentivo, carinho, amor, paciência e compreensão, pois por motivos de distância, nesses dois anos no mestrado não pude estar muito presente.

A minha família em Cristo, da Igreja Batista do Cassino, presentes de Deus na minha vida, e também aos demais irmãos da Assembléia de Deus que me acolheram no início do mestrado.

Ao meu querido professor e orientador, Dr. José María Monserrat, com quem tive a oportunidade de aprender muito. Obrigada por sua confiança em meu trabalho, pelo incentivo, ensinamentos, pelo tempo investido em mim e por sua paciência.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Wilson Wasielesky, pelo apoio e orientação no desenvolvimento dessa dissertação, e pela disposição em prover e disponibilizar recursos e materiais para a realização deste trabalho.

Aos demais professores do programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Aos meus amigos do laboratório BIFOA, Marcos, Cleber, Thamyres, Patty, Chaelen, Shadai e Rafael, com os quais convivi e aprendi muito, e que foram fundamentais no desenvolvimento desta dissertação. Ao Wesclen, irmão que a Engenharia de Pesca me deu há alguns anos, pelo apoio e por sempre acreditar no meu potencial. Ao Projeto Camarão, especialmente ao Inácio e Lucélia pela ajuda e incentivo, e a todos os outros que contribuíram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

Aos técnicos da EMA, seu Hermes, Django, Sandro e Alessandro. Meu agradecimento também para Elissandra (Índia) e Indiara, pelas longas conversas e boas risadas.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPERGS e FINEP pela concessão das bolsas e pelos recursos concedidos que possibilitam a execução da ciência no Brasil.

Um especial agradecimento aos nossos apoiadores Guabi, Trevisan, AllAqua, Inve e Aquatec pelo suporte e apoio irrestrito em todas as etapas deste trabalho, que são indispensáveis para realização das nossas pesquisas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação e composição proximal das dietas experimentais.....	21
Tabela 2. Efeito da inclusão de <i>Euterpe olarecea</i> sobre os parâmetros de desempenho zootécnico do <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados com dietas experimentais durante 35 dias e a composição proximal do músculo.....	26
Tabela 3. Concentração de polifenóis (mg de polifenóis/g de tecido) (A) e flavonóides (mg de flavonóides/g de tecido) (B) em ração, brânquias, hepatopâncreas e músculo de <i>L. vannamei</i> alimentados com duas dietas experimentais durante 35 dias.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Valores da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (expressos em área relativa) em (A) brânquias, (B) hepatopâncreas e (C) músculo de *Litopenaeus vannamei* expostos a diferentes concentrações de amônia. Valores expressos em média e ± 1 erro padrão (n = 12). Letras diferentes na mesma dieta indicam diferenças significativas entre as concentrações de amônia dentro de cada tipo de dieta e (*) indicam diferenças entre as dietas dentro de cada concentração de amônia de acordo com o teste de Newman-Keuls ao nível de significância a 0,05.....29

Figura 2. Concentração de glutathiona reduzida (μmol de GSH /mg de proteína) em (A) brânquias, (B) hepatopâncreas e (C) músculo de *Litopenaeus vannamei* expostos a diferentes concentrações de amônia. Valores expressos em média e ± 1 erro padrão (n = 12). Letras diferentes na mesma dieta indicam diferenças significativas entre as concentrações de amônia dentro de cada tipo de dieta e (*) indicam diferenças entre as dietas dentro de cada concentração de amônia de acordo com o teste de Newman-Keuls ao nível de significância a 0,05.....30

Figura 3. Atividade da glutathiona-S-transferase (nmol CDNB-GSH/min/mg de proteína) em (A) brânquias, (B) hepatopâncreas e (C) músculo de *Litopenaeus vannamei* expostos a diferentes concentrações de amônia. Valores expressos em média e ± 1 erro padrão (n = 12). Letras diferentes na mesma dieta indicam diferenças significativas entre as concentrações de amônia dentro de cada tipo de dieta e (*) indicam diferenças entre as dietas dentro de cada concentração de amônia de acordo com o teste de Newman-Keuls ao nível de significância a 0,05.....32

Figura 4. Concentração de grupos sulfidrila associados à proteínas (SH/mg de proteína) em (A) brânquias, (B) hepatopâncreas e (C) músculo de *Litopenaeus vannamei* expostos a diferentes concentrações de amônia. Valores expressos em média e ± 1 erro padrão (n = 12). Letras diferentes na mesma dieta indicam diferenças significativas entre as concentrações de amônia dentro de cada tipo de dieta e (*) indicam diferenças entre as

dietas dentro de cada concentração de amônia de acordo com o teste de Newman-Keuls
ao nível de significância a
0,05.....34

Figura 5. Conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol de TMP/mg por
tecido) em (A) brânquias, (B) hepatopâncreas e (C) músculo de *Litopenaeus vannamei*
expostos a diferentes concentrações de amônia. Valores expressos em média e ± 1 erro
padrão (n = 12). Letras diferentes na mesma dieta indicam diferenças significativas entre
as concentrações de amônia dentro de cada tipo de dieta e (*) indicam diferenças entre as
dietas dentro de cada concentração de amônia de acordo com o teste de Newman-Keuls
ao nível de significância a
0,05.....36

RESUMO

A exposição à amônia pode influenciar no aumento excessivo da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos organismos aquáticos. No entanto, o fornecimento de dietas com a suplementação ou inclusão de antioxidantes podem agir como uma alternativa de quimioproteção, amenizando efeitos deletérios causados pelas ERO. A fruta amazônica *Euterpe oleracea*, conhecida popularmente como “açai”, possui em sua composição grandes quantidades de compostos fenólicos que conferem a esta fruta uma excepcional capacidade antioxidante. Em razão disto, a inclusão de *E. oleracea* na dieta do *L. vannamei* poderia aumentar a resiliência desses animais para lidar com a toxicidade da amônia. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis danos oxidativos causados pela exposição à amônia em juvenis de *L. vannamei*, e se esses danos poderiam ser atenuados em função da presença do açai liofilizado na ração. Durante 35 dias, camarões com peso inicial (média \pm 1 erro padrão) de $0,97 \pm 0,03$ g foram alimentados com duas dietas experimentais em triplicata: dieta controle (sem inclusão de açai) e dieta com a inclusão de 10 % açai (P/P). Após esse período, camarões com peso médio de $3,87 \pm 0,04$ g foram distribuídos em 24 tanques com 40 L, contendo 10 camarões por caixa, e expostos durante 96 h a quatro concentrações sub-letais de amônia (0,01-controle; 0,26; 0,48; e 0,91 mg NH₃-N L⁻¹), representando um sistema fatorial de 2 (dieta com e sem açai) x 4 (total de concentrações de amônia testada) em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância modelo misto (ANOVA), sendo o fator aleatório as diferentes caixas utilizadas e os fatores fixos as dietas e as concentrações de amônia avaliadas. Para detectar possíveis diferenças entre os tratamentos foi aplicado o teste de Newman-Keuls com um nível de significância de 0,05. Amostras de brânquias, hepatopâncreas e músculo foram coletas para análises do conteúdo de polifenóis e flavonóides, da capacidade antioxidante total (ACAP), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona-S-transferase (GST), grupos sulfidrilas associados a proteínas (P-SH) e peroxidação lipídica (TBARS). A presença do açai na dieta não afetou os parâmetros zootécnicos do *L. vannamei*. O hepatopâncreas foi o único tecido que apresentou um incremento do conteúdo de polifenóis e flavonóides nos organismos alimentados com açai ($p < 0,05$). A ACAP das brânquias diminuiu significativamente em ambas as dietas após a exposição à amônia ($p < 0,05$), enquanto no músculo dos camarões alimentados com açai houve um aumento da capacidade antioxidante na mesma situação ($p < 0,05$). A perda de competência antioxidante nas brânquias favoreceu o aumento dos níveis de TBARS na dieta com açai neste tecido ($p < 0,05$). Ao contrário das brânquias, a diminuição do dano lipídico observado nos tratamentos 0,48 e 0,91 mg NH₃-N L⁻¹ no músculo dos camarões que consumiram açai, foi influenciado pelo aumento da ACAP ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas nas concentrações de GSH nos órgãos para ambas as dietas ($p > 0,05$). Nas brânquias, o açai promoveu uma queda significativa da atividade da GST em todas as concentrações de amônia em relação a dieta controle, e no músculo, diferentemente da dieta controle, o açai atuou na manutenção da GST, o que reforça os resultados encontrados no conteúdo de TBARS nestes tecidos, uma vez que o dano lipídico aumentou nas brânquias e diminuiu no músculo. A concentração de grupos sulfidrilas (P-SH) diminuiu significativamente nas brânquias e músculo dos camarões da dieta controle quando expostos à amônia, induzindo ao dano proteico, resposta que não foi observada na dieta com inclusão de açai no decorrer das concentrações de amônia. Em conclusão, a amônia induziu ao estresse oxidativo nas brânquias e músculo, entretanto, a inclusão do açai na dieta do *L. vannamei* apresentou efeitos antioxidantes

nos diferentes órgãos, não agravando o dano proteico nas brânquias e músculo e atenuando o dano lipídico no músculo.

Palavras-chave: capacidade antioxidante, compostos bioativos, compostos nitrogenados, estresse oxidativo, polifenóis

ABSTRACT

Exposure to ammonia may influence the excessive increase in the production of reactive oxygen species (ROS) in aquatic organisms. However, the provision of diets with supplementation or inclusion of antioxidants may act as an alternative to chemoprotection, alleviating deleterious effects caused by ROS. The Amazon fruit *Euterpe oleracea*, popularly known as "açai", has in its composition large amounts of phenolic compounds that give this fruit an exceptional antioxidant capacity. Because of this, the inclusion of *E. oleracea* in the diet of *L. vannamei* could increase the resilience of these animals to deal with ammonia toxicity. In this context, the objective of this study was to evaluate the possible oxidative damages caused by exposure to ammonia in juveniles of *L. vannamei*, and whether these damages could be attenuated due to the presence of lyophilized açai in the diet. For 35 days, shrimp with initial weight (mean \pm 1 standard error) of 0.97 ± 0.03 g were fed two experimental diets in triplicate: control diet (without the inclusion of açai) and diet with inclusion of 10% açai (P/P). After this period, shrimp with an average weight of 3.87 ± 0.04 g were distributed in 24 tanks with 40 L, containing 10 shrimps per tank, and exposed for 96 h to four sublethal concentrations of ammonia (0.01-control; 0.26, 0.48 and 0.91 mg NH₃-N L⁻¹), representing a factorial system of 2 (diet with and without açai) x 4 (total ammonia concentrations tested) in triplicate. The data were submitted to analysis of variance mixed model (ANOVA), being the random factor the different tanks used and the fixed factors the evaluated diets and ammonia concentrations. To detect possible differences between treatments, the Newman-Keuls test with a significance level of 0.05 was applied. Samples of gills, hepatopancreas and muscle were collected for analyses of the content of polyphenols and flavonoids, of total antioxidant capacity (ACAP), reduced glutathione (GSH), glutathione-S-transferase (GST), protein-associated sulfhydryl groups (P-SH) and lipid peroxidation (TBARS). The presence of açai in the diet did not affect the zootechnical parameters of *L. vannamei*. The hepatopancreas was the only tissue that presented an increase in the content of polyphenols and flavonoids in organisms fed with açai (p < 0.05). The ACAP of the gills decreased significantly in both diets after exposure to ammonia (p < 0.05), whereas in the muscle of açai-fed prawns there was an increase in antioxidant capacity in the same situation (p < 0.05). The loss of antioxidant competence in the gills favored increased levels of TBARS in the açai diet in this tissue (p < 0.05). In contrast to the gills, the decrease in lipid damage observed in treatments of 0.48 and 0.91 mg NH₃-N L⁻¹ in the muscle of shrimp that consumed açai was influenced by the increase in ACAP (p < 0.05). There were no significant differences in GSH concentrations in the organs for both diets (p > 0.05). In the gills, açai promoted a significant drop in GST activity in all concentrations of ammonia in relation to the control diet, and in the muscle, unlike the control diet, the açai acted to maintain the GST, which reinforces the results found in the content of TBARS in these tissues, since lipid damage increased in the gills and decreased in the muscle. The concentration of sulfhydryl groups (P-SH) decreased significantly in the gills and muscle of the control diet shrimp when exposed to ammonia, inducing protein damage, a response that was not observed in the açai inclusion diet. In conclusion, ammonia induced oxidative stress in the gills and muscle, however, the inclusion of açai in the diet of *L. vannamei* presented antioxidant effects in the different organs, not aggravating the protein damage in the gills and muscle and attenuating the lipidic damage in the muscle.

Key-words: antioxidant capacity, bioactive compounds, nitrogen compounds, oxidative stress, polyphenols

INTRODUÇÃO GERAL

Com o aumento da população humana, a demanda por recursos naturais e a necessidade da produção de alimentos tem aumentado consideravelmente, tornando-se um dos grandes desafios mundiais. Frente a esta situação, a aquicultura é considerada como uma alternativa para a produção de proteína de alta qualidade, contribuindo com a segurança alimentar e nutricional (FAO 2016).

A aquicultura tem sido o setor de produção de alimentos de origem animal com maior taxa de crescimento, sendo responsável pelo fornecimento de pescado para o consumo humano. Em 2015, o pescado representou aproximadamente 17% do total de proteína animal consumida pela população mundial (FAO, 2018). A produção pesqueira mundial alcançou em 2016 cerca de 171 milhões de toneladas, dos quais, a aquicultura representou 47% dessa produção. Já a produção de pescados comestíveis foi estimada em 80 milhões de toneladas, sendo 7,9 milhões de toneladas pertencentes à produção de crustáceos (FAO, 2018).

A carcinicultura é uma das atividades aquícolas com maior potencial econômico e produtivo e que mais tem se expandido no mundo. Dentre o cultivo de crustáceos, o camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Booner 1931), pertencente à família Penaeidae, é a espécie que mais tem sido produzida e comercializada mundialmente, representando 4,1 milhões de toneladas (53%) do total da produção mundial (FAO, 2018). Suas características zootécnicas, tais como, alta taxa de crescimento e sobrevivência, eficiência na conversão alimentar, tolerância a amplas faixas de salinidade e temperatura, e todo um pacote tecnológico já bem estabelecido, que inclui os requisitos nutricionais desta espécie, as faixas de parâmetros físico-químicos da água ideais para o crescimento e o manejo adequado desde a fase da larvicultura a engorda, facilitam o cultivo desta espécie (Xu e Pan, 2012; Jia *et al.*, 2015).

Na década de 80, a produção de camarões era principalmente baseada em sistemas de cultivo extensivo, caracterizados pela baixa densidade de estocagem. Na década seguinte, assim como nos dias atuais, devido ao melhoramento das técnicas aquícolas, as condições de cultivo foram intensificando-se com o objetivo de aumentar a produtividade dos sistemas (Wasielisky *et al.*, 2006; 2017).

Na aquicultura, a manutenção dos parâmetros da qualidade da água adequados à espécie em cultivo é essencial para o sucesso do empreendimento aquícola, pois estes fatores podem ser decisivos para aumentar ou reduzir a produtividade dos sistemas de

produção (Campos *et al.*, 2015). Em sistemas tradicionais de cultivo, a fim de manter a qualidade da água dentro dos parâmetros ideais para o crescimento e sobrevivência dos camarões, é comum a realização de altas taxas de renovações de água (Krummenauer *et al.*, 2014). Porém, um dos principais problemas relacionados à deterioração da qualidade de água em sistemas de cultivo intensivo do camarão *L. vannamei*, mesmo com renovações de água, é a geração e o acúmulo de resíduos nitrogenados nestes sistemas.

As rações utilizadas no cultivo do *L. vannamei* contêm altos níveis proteicos (35 a 46%), e com o incremento das densidades de estocagem e consumo desses alimentos, a liberação de excreção de nitrogênio para o meio, sobretudo na forma de amônia, aumentam (Wasielesky *et al.*, 2017). A amônia, produto final do catabolismo das proteínas dos organismos aquáticos, é o principal composto nitrogenado presente no meio, originada a partir das excretas dos animais, degradação dos restos de alimentos e decomposição dos sólidos orgânicos (Barbieri *et al.*, 2016).

No ambiente aquático, a amônia está presente sob duas formas: amônia ionizada (NH_4^+) e a não ionizada (NH_3), e quando somadas constituem a amônia total ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$). A proporção relativa de cada uma dessas formas é influenciada diretamente pelo pH da água, seguido da temperatura e salinidade (Baldisseroto, 2013).

A forma não ionizada é considerada a mais tóxica, pois em função de sua natureza lipofílica é capaz de difundir-se facilmente através das membranas branquiais (Romano e Zang, 2013). Dependendo da concentração e do tempo de exposição, os efeitos tóxicos causados por estes resíduos podem ser sub-letais ou letais em diferentes espécies de camarões (Campos *et al.*, 2015; Wasielesky *et al.*, 2017).

O acúmulo de amônia em tanques de cultivo pode causar alterações fisiológicas (Romano e Zang, 2013), incluindo alterações metabólicas, redução no crescimento, aumento das taxas de consumo de oxigênio, diminuição da capacidade antioxidante e estresse oxidativo, e em casos extremos causar mortalidade em organismos aquáticos (Barbieri, 2010; Jia *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

Pesquisas têm demonstrado que a exposição à amônia em peixes e crustáceos é capaz de induzir ao aumento excessivo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Zhang *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2016; Pinto *et al.*, 2016; Maltez *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018), fenômeno que como dito anteriormente, pode apresentar alterações bioquímicas de importância.

ERO é um termo que caracteriza espécies moleculares ou um grupo de oxidantes, que oxidam e danificam biomoléculas, como proteínas, lipídios, DNA e RNA, com os

consequentes efeitos deletérios das funções biológicas (Sies, 2015; Liang *et al.*, 2016). A geração ERO pode ocorrer em diferentes tecidos, como resultado do processo de redução do oxigênio molecular (O_2), comum para todos os seres aeróbicos. Neste processo, simultaneamente há a formação de elementos intermediários tóxicos e reativos, tais como radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (HO^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podendo ser nocivos quando o sistema de defesa antioxidante não consegue interceptá-los (Hermes-Lima, 2004). Ao longo da evolução, o O_2 foi fundamental para o processo de respiração mitocondrial, possibilitando um aumento notável na eficiência de geração de ATP (Hermes-Lima *et al.*, 2015). Em células aeróbicas existem diferentes vias metabólicas que possibilitam a produção de ERO, sendo as mitocôndrias as principais fontes endógenas desta produção, a qual é ocasionada durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória (Banh *et al.*, 2016). Desta maneira, a necessidade de eliminar, interceptar e prevenir os danos oxidativos causados pela ação das ERO, levaram todos os organismos aeróbicos ao desenvolvimento de um complexo sistema de defesas antioxidantes formado por defesas enzimáticas e não enzimáticas (Comporti, 2010).

O sistema de defesa enzimático é composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione reductase (GR), e a glutathione S-transferase (GST), dentre outras. As defesas antioxidantes não enzimáticas são compostas pela glutathione reduzida (GSH) e por substâncias obtidas por meio da dieta, como o α -tocoferol (vitamina E), ácido lipóico, ácido ascórbico (vitamina C), além de carotenóides e flavonóides (Vasconcelos *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2010; Kütter *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015).

A enzima SOD catalisa a dismutação do superóxido em O_2 e H_2O_2 . Já o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é convertido em H_2O e O_2 , reação a qual é catalisada pela catalase (CAT). No caso da GPx, é uma enzima que atua na detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos e utiliza o antioxidante endógeno glutathione reduzida (GSH) como cofator (Wu *et al.*, 2015). A glutathione reduzida (GSH) é formada pela combinação de três resíduos de aminoácidos (cisteína, glicina e glutamina), formando um tripéptido que contém um grupo tiol (SH), e encontra-se presente nos organismos nas formas reduzidas (GSH) e oxidada (GSSG) (Wang *et al.*, 2018). Esta molécula atua na preservação do estado redox celular, agindo como primeira ação de defesa contra a geração excessiva de ERO e na detoxificação de xenobióticos (Ventura-Lima *et al.*, 2009). A GR é uma enzima que tem o papel de reciclar a GSH a partir da GSSG (Hermes-Lima, 2004; Ventura-Lima *et al.*, 2009). A GST é uma família de enzimas multifuncionais, tendo sua atividade

relacionada na detoxificação celular de xenobióticos e metabólitos endógenos (Zhou *et al.*, 2009).

As defesas enzimáticas e não enzimáticas constituem um sistema de defesa antioxidante complexo, o qual pode ser mensurado em forma global com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante total dos organismos contra ERO (Amado *et al.*, 2009). Em condições fisiológicas normais, a produção de ERO é balanceada pelos sistemas de defesas enzimática e não enzimática, havendo um equilíbrio entre os agentes de defesas antioxidantes e pró-oxidantes nos organismos (Lushchak, 2011). No entanto, situações de exposição à poluentes, como por exemplo a amônia, ou alterações das variáveis ambientais, podem acarretar na perturbação deste equilíbrio, com a predominância de compostos oxidantes.

A produção de ERO não necessariamente causam danos celulares (Amado *et al.*, 2009), no entanto, quando sua acumulação vai além da capacidade de defesa dos sistemas antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo (Lushchak, 2011; Liang *et al.*, 2016). O estresse oxidativo pode ser resultado de um desequilíbrio entre altas concentrações de pró-oxidantes sobre os antioxidantes, causando dano oxidativo, e/ou perturbação das vias de sinalização celular (Jones, 2006).

Pesquisas envolvendo a suplementação ou inclusão de antioxidantes na alimentação têm ganhado destaque no setor aquícola, pois podem agir como uma alternativa de quimioproteção contra os efeitos do estresse oxidativo em organismos aquáticos, os quais são causados em diferentes situações durante o cultivo, melhorando a defesa imunológica e amenizando os efeitos deletérios causados pelas ERO (Monserrat *et al.*, 2008; Amado *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016; Da Silva Martins *et al.*, 2018; León *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

Os alimentos funcionais são aqueles que além de trazer benefícios nutricionais, exercem efeitos bioquímicos e fisiológicos, melhorando as defesas antioxidantes e prevenindo o risco do desenvolvimento de doenças (Asgary *et al.*, 2018). Estes alimentos contam com a presença de compostos bioativos, presentes naturalmente em pequenas quantidades em frutas e vegetais, os quais, dentre suas principais ações biológicas, apresentam ação antioxidante (Kaur e Singh, 2017). Os principais compostos bioativos de natureza antioxidante encontrados em frutas e vegetais são os compostos fenólicos e carotenoides (Septembre-Malaterre *et al.*, 2018).

A inclusão de polpa de frutas ricas em carotenoides, polifenóis e flavonóides em dietas, como por exemplo a pupunha (*Bactris gasipaes*), buriti (*Mauritia flexuosa*) e o

açai (*Euterpe oleracea*), têm demonstrado resultados satisfatórios quanto a seu efeito quimioprotetor (Baldizán *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2010; Aquino *et al.*, 2015). No Brasil, especificamente no bioma amazônico, é possível encontrar esses frutos, os quais, devido tais características, apresentam capacidade antioxidante e potencial uso como suplementos e inclusão em dietas.

O *Euterpe oleracea* é uma espécie de palmeira endêmica da região amazônica, cujo fruto é pequeno, arredondado e com coloração roxo-escuro em função dos pigmentos naturais (Schauss, 2016), sendo o Brasil o maior produtor e exportador deste fruto. O estado do Pará é responsável por cerca de 99% do cultivo nacional, seguido dos estados Maranhão, Amapá, Acre e Rondônia (FAPESPA, 2017). A polpa do açai tem sido muito utilizada como matéria-prima para a fabricação de sucos, sorvetes e bebidas, sendo exportada para diferentes países (De Souza *et al.*, 2010; Odendaal e Schauss, 2014). Por ser altamente perecível e de rápida degradação, alterações sensoriais e nutricionais modificam as características naturais deste produto. Desta maneira, técnicas de conservação, como a liofilização, são empregadas com o objetivo de preservar a composição nutricional e fitoquímica da polpa, viabilizando a execução de estudos *in vitro* e *in vivo* (Odendaal e Schauss, 2014).

Nas últimas décadas, a polpa do açai tem atraído interesse e sido alvo de muitas pesquisas em função de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e nutricionais (Schauss *et al.*, 2006, Martino *et al.*, 2016; Schauss, 2016). A polpa do açai é rica em ácidos graxos insaturados, fibras, e minerais, e a alta capacidade antioxidante deste fruto deve-se à presença de polifenóis e flavonóides, principalmente as antocianinas, em sua composição (Schauss, 2016). Estudos envolvendo a administração de extratos de açai *in vivo* tem demonstrado um aumento na capacidade antioxidante do plasma de seres humanos (Mertens-Talcott *et al.*, 2008), melhora dos níveis de colesterol em ratos hipercolesterolêmicos (De Souza *et al.*, 2010), efeito anti-hipertensivo (Da Costa *et al.*, 2012) e ação vasodilatadora no leito vascular mesentérico de ratos (Rocha *et al.*, 2007).

Em função da presença de polifenóis, alta capacidade antioxidante e altos níveis de lipídios, o uso da polpa liofilizada do açai pode se tornar uma alternativa para a administração de antioxidantes em dietas para organismos aquáticos, pois possui capacidade de estimular o aumento dos sistemas de defesas antioxidantes endógenos e exógenos, combatendo os efeitos do estresse oxidativo (Gordon, 1996; Schauss, 2016). Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar as respostas de defesas antioxidantes e dano oxidativo durante a exposição à amônia no camarão *L. vannamei* e

a ação quimioprotetora da inclusão de *Euterpe oleracea* na dieta, com a finalidade de melhorar a capacidade antioxidante e assim amenizar os mecanismos de toxicidade da amônia e o dano oxidativo neste crustáceo.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar as respostas de defesas antioxidantes e a geração de dano oxidativos derivados da exposição à amônia em juvenis de camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* alimentados com dieta com inclusão de açaí (*Euterpe oleracea*) liofilizado como agente quimioprotetor.

Específicos

- Avaliar o desempenho zootécnico de juvenis de *L. vannamei* alimentados com dietas com inclusão de polpa liofilizada do fruto de *E. oleracea*.
- Avaliar a resposta antioxidante e de dano oxidativo nas brânquias, hepatopâncreas e músculo de *L. vannamei* após submetê-lo a níveis sub-letais de cloreto de amônia.
- Avaliar o efeito da inclusão da polpa liofilizada do fruto de *E. oleracea* na dieta de *L. vannamei* na capacidade antioxidante e de dano oxidativo destes animais quando expostos à concentrações sub-letais de cloreto de amônia.

REFERÊNCIAS

- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S, Monserrat, J.M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*, 407(6), 2115-2123.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Pereira, T.C., Yunes, J.S., Bogo, M.R., Monserrat, J.M. 2011. Chemoprotection of lipoic acid against microcystin-induced toxicosis in common carp (*Cyprinus carpio*, Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154, 146-153.
- Aquino, J.D.S., Soares, J.K.B., Magnani, M., Stamford, T.C.M., Mascarenhas, R.D.J., Tavares, R.L., Stamford, T.L.M. 2015. Effects of dietary Brazilian palm oil (*Mauritia flexuosa* L.) on cholesterol profile and vitamin A and E status of rats. *Molecules*, 20(5), 9054-9070.
- Asgary, S., Rastqar, A., Keshvari, M. 2018. Functional food and cardiovascular disease prevention and treatment: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 37(5), 429-455.
- Baldisseroto, B. 2013. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria, RS. 3º ed. Ed. UFSM. 352.
- Baldizan, G., Oviedo, M., Michelangeli, C., Vargas, R.E. 2010. Effects of peach palm oil on performance, serum lipoproteins and haemostasis in broilers. *British Poultry Science*, 51(6), 784-790.
- Banh, S., Wiens, L., Sotiri, E., Treberg, J.R. 2016. Mitochondrial reactive oxygen species production by fish muscle mitochondria: potential role in acute heat-induced oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 191, 99-107.
- Barbieri, E. 2010. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture*, 306(1-4), 329-333.
- Barbieri, E., Bondioli, A.C.V., de Melo, C.B., Henriques, M.B. 2016. Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture Research*, 47(4), 1260-1268.
- Campos, B.R., Furtado, P.S., D’Incao, F., Poersch, L., Wasielesky, W. 2015. The chronic toxicity of ammonia, nitrite and nitrate on juvenile *Farfantepenaeus brasiliensis*

- (CRUSTACEA: DECAPODA). *Boletim Instituto de Pesca*. São Paulo, 41(2): 261–269.
- Comporti, M., 2010. Free radicals, oxidative stress and antioxidants. *Journal of the Siena Academy of Sciences*. 2, 13–26.
- Da Costa, C.A., de Oliveira, P.R.B., de Bem, G.F., de Cavalho, L.C.R.M., Ognibene, D.T., da Silva, A.F.E., Valença, S.S., Pires, K.M.P., Souza, P.J.C., de Moura, R.S., Resende, A.C. 2012. *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385(12), 1199-1209.
- Da Silva Martins, Á.C., Artigas Flores, J., Porto, C., Romano, L.A., Wasielesky Junior, W., Caldas, S. S., Primel, E.G., Külkamp-Guerreiro, I.C., Monserrat, J.M. 2018. Antioxidant effects of nanoencapsulated lipoic acid in tissues and on the immune condition in haemolymph of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Nutrition*, 24(4), 1255-1262.
- Da Silva Menezes, E.M., Torres, A.T., Srur, A.U.S. 2008. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amazonica*, 38(2), 311-316.
- De Souza, M.O., Silva, M., Silva, M.E., de Paula Oliveira, R., Pedrosa, M.L. 2010. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*, 26(7-8), 804-810.
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. 250 pp.
- FAPESPA. 2017. Boletim agropecuário do Pará 2017. Belém. 92 pp.
- Gordon, M.H. 1996. Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Product Reports*, 13(4), 265-273.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals, in: Storey, K.B. (Ed.), *Functional metabolism: Regulation and adaptation*. Wiley-Liss, Hoboken, pp. 319-368.
- Hermes-Lima, M., Moreira, D.C., Rivera-Ingraham, G.A., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos, T. C., Campos, É.G. 2015. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1122-1143.

- Jia, X., Zhang, D., Wang, F., Dong, S. 2015. Immune responses of *Litopenaeus vannamei* to non-ionic ammonia stress: a comparative study on shrimps in freshwater and seawater conditions. *Aquaculture Research*, 48(1), 177-188.
- Jones, D.P. 2006. Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging. *Rejuvenation Research*, 9(2), 169-181.
- Kaur, N., Singh, D.P. 2017. Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. *Appetite*, 112, 167-187.
- Krummenauer, D., Samocha, T., Poersch, L., Lara, G., Wasielesky Jr, W. 2014. The reuse of water on the culture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT system. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(1), 3-14.
- Kütter, M.T., Romano, L.A., Ventura-Lima, J., Tesser, M.B., Monserrat, J.M., 2014. Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-lipoic acid in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 162, 70–76.
- León, D.C.M., Wasielesky Junior, W., Monserrat, J.M. 2018. Quercetin influence in water quality and biochemical responses of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in Biofloc Technology System. *Aquaculture Research*, 49(11), 3569-3576.
- Liang, Z., Liu, R., Zhao, D., Wang, L., Sun, M., Wang, M., Song, L. 2016. Ammonia exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 523-528.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 4, 118-126.
- Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30.
- Maltez, L.C., Stringhetta, G.R., Enamorado, A.D., Okamoto, M.H., Romano, L.A., Monserrat, J.M., Sampaio, L.A., Garcia, L. 2017. Ammonia exposure and subsequent recovery trigger oxidative stress responses in juveniles of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(6), 1747-1759.
- Martino, H.S.D., dos Santos Dias, M.M., Noratto, G., Talcott, S., Mertens-Talcott, S.U. 2016. Anti-lipidaemic and anti-inflammatory effect of açai (*Euterpe oleracea* Martius) polyphenols on 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Functional Foods*, 23, 432-443.

- Mertens-Talcott, S.U., Rios, J., Jilma-Stohlawetz, P., Pacheco-Palencia, L.A., Meibohm, B., Talcott, S.T., Derendorf, H. 2008. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7796-7802.
- Monserrat, J.M., Lima, J.V., Ferreira, J L.R., Acosta, D., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Moraes, T.B., dos Santos, L.C., Amado, L.L. 2008. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(3), 287-292.
- Odendaal, A.Y., Schauss, A.G. 2014. Potent antioxidant and anti-inflammatory flavonoids in the nutrient-rich Amazonian palm fruit, açai (*Euterpe spp.*). *Polyphenols in Human Health and Disease*, pp. 219-239.
- Pereira, L.P.F., Mercante, C.T.J. 2005. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. *Boletim do Instituto de Pesca*, 31(1), 81-88.
- Pinto, M.R., Lucena, M.N., Faleiros, R.O., Almeida, E.A., McNamara, J.C., Leone, F.A. 2016. Effects of ammonia stress in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Aquatic Toxicology*, 170, 13-23.
- Rocha, A.P.M., Carvalho, L.C.R.M., Sousa, M.A.V., Madeira, S.F., Sousa, P.J.C., Tano, T., Schini-Kerth, V.B., Resende, A.C., De Moura, R.S. 2007. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart.(Acai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascular Pharmacology*, 46(2), 97-104.
- Romano, N., Zeng, C. 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1), 1-21.
- Schauss, A.G. 2016. Advances in the study of the health benefits and mechanisms of action of the pulp and seed of the Amazonian palm fruit, *Euterpe oleracea* Mart., known as “Açai”. *Fruits, Vegetables, and Herbs*, pp. 179-220.
- Schauss, A.G., Wu, X., Prior, R.L., Ou, B., Huang, D., Owens, J., Agarwal, A., Jensen, G.S., Hart, A.N., Shanbrom, E. 2006. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart.(acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8604-8610.

- Septembre-Malaterre, A., Remize, F., Poucheret, P. 2018. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International*, 104, 86-99.
- Sies, H., 2015. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180-183.
- Vasconcelos, S.M., Goulart, M.O., Moura, J.B., Manfredini, V., Benfato, M.S., Kubota, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30, 1323-1338.
- Ventura-Lima, J., de Castro, M.R., Acosta, D., Fattorini, D., Regoli, F., de Carvalho, L.M., Bohrer, D., Geracitano, L.A., Barros, D.M., Marins, L.F.F., da Silva, R.S., Bonan, C.D., Bogo, M.R., Monserrat, J.M. 2009. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(4), 538-543.
- Wang, X., Xu, W., Zhou, H., Zhang, Y., Gao, W., Zhang, W., Mai, K. 2018. Reduced glutathione supplementation in practical diet improves the growth, anti-oxidative capacity, disease resistance and gut morphology of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 73, 152-157.
- Wang, Y., Liang, J.P., Duan, Y.F., Niu, J., Wang, J., Huang, Z., Lin, H.Z. 2017. Effects of dietary *Rhodiola rosea* on growth, body composition and antioxidant capacity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal conditions and combined stress of low-salinity and nitrite. *Aquaculture Nutrition*, 23(3), 548-559.
- Wasielesky Jr, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258(1-4), 396-403.
- Wasielesky, W.J., Poersch, L.H., Martins, T.G., Miranda-Filho, K.C. 2017. Chronic effects of nitrogenous compounds on survival and growth of juvenile pink shrimp. *Brazilian Journal of Biology*, 77(3), 558-565.
- Wu, S.M., Liu, J.H., Shu, L.H., Chen, C.H. 2015. Anti-oxidative responses of zebrafish (*Danio rerio*) gill, liver and brain tissues upon acute cold shock. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 187, 202-213.

- Xu, D.D., Liu, X.H., Cao, J.M., Du, Z.Y., Huang, Y.H., Zhao, H.X., Zhu, X., Zhou, M., Lan, H.B., Xie, C.X. 2012. Dietary glutathione as an antioxidant improves resistance to ammonia exposure in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 43(2), 311-316.
- Xu, W.J., Pan, L.Q. 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture*, 356: 147–152.
- Zhang, M., Li, M., Wang, R., Qian, Y. 2018. Effects of acute ammonia toxicity on oxidative stress, immune response and apoptosis of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and the mitigation of exogenous taurine. *Fish & Shellfish Immunology*. 79: 313-320.
- Zhang, Y., Ye, C., Wang, A., Zhu, X., Chen, C., Xian, J., Sun, Z. 2015. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in giant freshwater pawn (*Macrobrachium rosenbergii*): effects on the oxidative stress, antioxidant enzymatic activities and apoptosis in haemocytes. *Ecotoxicology*, 24: 1601-1610.
- Zhou, J., Wang, W.N., Wang, A.L., He, W.Y., Zhou, Q.T., Liu, Y., Xu, J. 2009. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and regulation under pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150: 224-230.

CAPÍTULO 1

**Avaliação de defesas antioxidantes e de dano oxidativo em juvenis do camarão
Litopenaeus vannamei (BOONE, 1931) exposto à amônia: O papel do açaí (*Euterpe
oleracea* Mart. 1824) como agente quimioprotetor**

Artigo a ser submetido à Revista Aquaculture Research

Obs: Figuras e Tabelas incluídas no corpo do texto para facilitar a leitura.

1 **Avaliação de defesas antioxidantes e de dano oxidativo em juvenis do camarão**
2 ***Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) exposto à amônia: O papel do açaí (*Euterpe***
3 ***oleracea* Mart. 1824) como agente quimioprotetor**

4

5 Grecica Mariana Colombo^{1,3}, Cleber dos Santos Simião^{1,3}, Marcos Josué Schmitz^{1,3},
6 Patrícia Baptista Ramos^{1,3}, Marcelo Borges Tesser^{3,4}, Wilson Wasielesky^{2,3}, José María
7 Monserrat^{1,3,5}

8

9 ¹Laboratório de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos – BIFOA, Instituto de Oceanografia (IO),
10 Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

11 ²Laboratório de Carcinocultura, Instituto de Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande -
12 FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

13 ³Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande,
14 RS, Brasil.

15 ⁴Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA), Instituto de Oceanografia (IO),
16 Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

17 ⁵Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS,
18 Brasil.

19

20 **Autor Correspondente:** José María Monserrat, Instituto de Ciências Biológicas (ICB),
21 Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Av. Itália km 8 s/n, Cx. P.
22 474, CEP 96200-970, Brasil. E-mail: monserrat_jm@furg.br

23

24 **Resumo**

25 Juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei* foram alimentados com duas dietas
26 experimentais: controle e dieta com inclusão de açaí *Euterpe oleracea* a 10% (P/P)
27 durante 35 dias. Após foram expostos durante 96h a quatro concentrações de amônia
28 (0,01-controle; 0,26; 0,48 e 0,91 mg NH₃-N L⁻¹). Amostras de brânquias, hepatopâncreas
29 e músculo foram coletadas. O açaí na dieta não afetou os parâmetros zootécnicos do *L.*
30 *vannamei*. No hepatopâncreas o conteúdo de polifenóis e flavonoides aumentou nos
31 camarões alimentados com açaí. A capacidade antioxidante total (ACAP) das brânquias
32 diminuiu significativamente em ambas as dietas quando expostos à amônia, enquanto que
33 no músculo o açaí promoveu um aumento da capacidade antioxidante.
34 Concomitantemente, os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) aumentaram nas
35 brânquias e diminuíram no músculo. A atividade da glutathione-S-transferase (GST)
36 aumentou no hepatopâncreas da dieta com açaí na concentração de 0,26 mg NH₃-N L⁻¹,
37 o que pode facilitar a detoxificação de subprodutos de peroxidação lipídica nesta mesma
38 concentração. A concentração de grupos sulfidrila associados à proteínas (P-SH)

39 diminuiu significativamente nas brânquias e músculo dos camarões da dieta controle,
40 induzindo ao dano proteico, resposta não observada na dieta com açaí no decorrer das
41 concentrações de amônia. A amônia induziu ao estresse oxidativo nas brânquias e
42 músculo, entretanto, o açaí apresentou ação quimioprotetora no hepatopâncreas e
43 melhorou o sistema de defesa antioxidante, não agravando o dano proteico nas brânquias
44 e músculo e atenuando o dano lipídico no músculo.

45

46 **Palavras-chave:** capacidade antioxidante, compostos bioativos, compostos nitrogenados,
47 estresse oxidativo, polifenóis

48

49 1. INTRODUÇÃO

50 O camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Booner 1931) é a espécie de
51 crustáceo mais cultivada e comercializada mundialmente, principalmente devido a suas
52 características zootécnicas de cultivo e a ampla capacidade de adaptação ambiental (Jia,
53 Zhang, Wang, & Dong, 2015; FAO, 2018).

54 Através do melhoramento de técnicas aquícolas, as condições de cultivo têm se
55 intensificado, aumentando a produção deste crustáceo. Entretanto, um dos fatores
56 limitantes em sistemas de cultivo intensivo, é a geração e acúmulo de resíduos
57 nitrogenados, principalmente a amônia, originados a partir das excretas dos animais,
58 degradação dos restos de alimentos e decomposição dos detritos orgânicos (Romano &
59 Zang, 2013; Jia et al., 2015; Wasielesky, Poersch, Martins, & Miranda-Filho, 2017).

60 A amônia, produto final do catabolismo das proteínas dos organismos aquáticos,
61 está presente na água sob duas formas, amônia ionizada (NH_4^+) e a não ionizada (NH_3),
62 e quando somadas constituem a amônia total (NAT). A forma não ionizada é considerada
63 a mais tóxica, pois em função de sua natureza lipofílica é capaz de difundir-se com
64 facilidade através das membranas branquiais (Romano & Zang, 2013).

65 Elevadas concentrações de amônia tendem a se acumular nos fluidos corporais de
66 organismos aquáticos (Liang et al., 2016) e, dependendo da concentração e do tempo de
67 exposição, os efeitos tóxicos podem ser sub-letais ou letais, dependendo da espécie,
68 incluindo camarões. Dentre esses efeitos destacam-se distúrbios osmorregulatórios
69 (Romano & Zang, 2012), aumento do consumo de oxigênio (Racotta & Hernández-
70 Herrera, 2000; Barbieri, 2010), diminuição das taxas de crescimento e aumento da
71 mortalidade (Campos, Furtado, D’Incao, Poersch, & Wasielesky, 2015; Wasielesky et al.,
72 2017), alterações histológicas (Dutra et al., 2017; Han et al., 2017), supressão do ciclo de
73 Krebs e desacoplamento da fosforilação oxidativa (Ding et al., 2017), diminuição da
74 capacidade antioxidante e estresse oxidativo (Jia et al., 2015; Zhang et al., 2015).

75 A ocorrência de estresse oxidativo acontece devido ao desequilíbrio entre elevadas
76 concentrações de pró-oxidantes, que incluem as chamadas espécies reativas de oxigênio
77 (ERO), e antioxidantes, resultando em danos às biomoléculas, como proteínas, lipídios e
78 DNA (Jones, 2006; Sies, 2015; Zhang et al., 2015; Liang et al., 2016). As ERO são
79 formadas durante o processo do metabolismo aeróbico, e os camarões, como qualquer
80 organismo aeróbico, são vulneráveis à ação de ERO quando produzidas em excesso em
81 relação à capacidade antioxidante do organismo (Kütter, Romano, Ventura-Lima, Tesser,
82 & Monserrat, 2014).

83 Estudos recentes têm demonstrado que a exposição de peixes e crustáceos à amônia
84 é capaz de influenciar no aumento excessivo da produção de ERO (Zhang et al, 2015;
85 Liang et al., 2016; Pinto et al., 2016; Maltez et al., 2017; Zhang, Li, Wang, & Qian, 2018).
86 Parte da toxicidade da amônia está relacionada com a capacidade desta em influenciar
87 diretamente no funcionamento do ciclo de Krebs. A incorporação de grupos amônio ao α -
88 cetogluturato catalisado pela glutamato desidrogenase, retira este intermediário do ciclo
89 de Krebs, afetando a produção de ATP. Além disso, a amônia é capaz de inibir algumas
90 enzimas intermediárias importantes neste ciclo, como a α -cetogluturato desidrogenase,
91 prejudicando a produção de ATP (Hertz & Kala, 2007). A depleção de ATP faz com que
92 o organismo perca capacidade de produzir antioxidantes endógenos e aumente a produção
93 de ERO (Kosenko et al., 1997). No entanto, os organismos aeróbicos, como forma de
94 combater e prevenir os danos oxidativos causados pelo excesso de ERO, contam com
95 sistemas de defesas antioxidante enzimáticos (superóxido dismutase (SOD), glutational
96 peroxidase (GPx) e catalase (CAT), glutational redutase (GR), glutational S-transferase
97 (GST), dentre outros) e não-enzimáticos (glutational reduzida (GSH), vitamina-E,
98 vitamina-C, β - caroteno, ácido lipóico, flavonóides, dentre outros) (Vasconcenlos et al.,
99 2007; Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010; Wu, Liu, Shu, & Chen, 2015).

100 Nos últimos tempos, pesquisas envolvendo o fornecimento de dietas com a
101 suplementação ou inclusão de antioxidantes têm ganhado importância no setor aquícola,
102 pois podem agir como uma alternativa de quimioproteção contra os efeitos do estresse
103 oxidativo em organismos aquáticos, uma vez que o aumento da produção de ERO pode
104 ocorrer em função de vários processos no ambiente de cultivo e durante o manejo destes
105 organismos, como o transporte, queda do oxigênio com posterior re-oxigenação,
106 variações na temperatura, assim como a exposição a altas concentrações de compostos
107 nitrogenados, entre outros (Monserrat et al., 2008; Amado et al., 2011; Xu et al., 2012;

108 Wang et al., 2016; Da Silva, Barbas, Torres, Sampaio & Monserrat, 2017; Da Silva
109 Martins et al., 2018; León, Wasielesky, & Monserrat, 2018; Wang et al., 2018).

110 Compostos bioativos de natureza antioxidante estão presentes em frutas e vegetais,
111 tais como compostos fenólicos e carotenoides (Kaur & Singh, 2017; Setembro-
112 Malaterre, Remize, & Poucheret, 2018). A inclusão de polpa de frutos amazônicos em
113 dietas animais, como a pupunha (*Bactris gasipaes*), buriti (*Mauritia flexuosa*) e o açaí
114 (*Euterpe oleracea*), ricos em carotenoides, polifenóis e flavonóides, têm demonstrado
115 resultados satisfatórios quanto a aspectos nutricionais, quimioprevenção de doenças e
116 melhora da capacidade antioxidante (Baldizán, Oviedo, Michelangeli, & Vargas, 2010;
117 De Souza, Silva, Silva, de Paula Oliveira, & Pedrosa, 2010; Aquino et al., 2015; Dos
118 Santos, et al., 2016).

119 O açaizeiro (*Euterpe oleracea*) é uma espécie de palmeira endêmica da região
120 amazônica. Seu fruto é pequeno, arredondado e apresenta coloração roxo-escuro devido
121 principalmente a presença de antocianinas (Schauss et al., 2006). O Brasil é o maior
122 produtor, consumidor e exportador do açaí, fruto no qual tem sido muito utilizado como
123 matéria-prima para a fabricação de sucos, sorvetes e bebidas (De Souza et al., 2010;
124 Odendaal & Schauss, 2014). O comércio e o consumo *in natura* de sua polpa são muito
125 comuns nas regiões produtoras. Entretanto, em função da alta perecibilidade e rápida
126 degradação enzimática causada por peroxidases e polifenoloxidasas que resultam em
127 alterações sensoriais e nutricionais, técnicas de conservação necessitam ser empregadas
128 com o objetivo de aumentar sua durabilidade (Da Silva Menezes, Torres, & Srur, 2008).
129 Um dos métodos de conservação é o processo de liofilização, o qual permite a preservação
130 da composição nutricional e fitoquímica da polpa, viabilizando estudos *in vitro* e *in vivo*
131 (Odendaal & Schauss, 2014).

132 Nos últimos anos, tem se atribuído considerável atenção a polpa do açaí, devido
133 suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e nutricionais (Schauss et al., 2006;
134 Martino, dos Santos Dias, Noratto, Talcott, & Mertens-Talcott, 2016; Schauss, 2016). A
135 alta capacidade antioxidante deste fruto deve-se à presença de polifenóis e flavonóides,
136 incluindo as antocianinas, em sua composição (Schauss, 2016). Estudos envolvendo a
137 administração de extratos de açaí *in vivo* tem demonstrado um aumento na capacidade
138 antioxidante do plasma de seres humanos (Mertens-Talcott et al., 2008), proteção contra
139 estresse oxidativo e lesões renais em ratos diabéticos (Cordeiro et al., 2017), melhora dos
140 níveis de colesterol em ratos hipercolesterolêmicos (De Souza et al., 2010), efeito anti-
141 hipertensivo (Da Costa et al., 2012) e ação vasodilatadora no leito vascular mesentérico

142 de ratos (Rocha et al., 2007), e melhora da capacidade antioxidante e redução de ERO no
143 nematóide *Caenorhabditis elegans* (Bonomo et al., 2014).

144 Em função da presença de polifenóis, alta capacidade antioxidante e altos níveis de
145 ácidos graxos insaturados, o uso da polpa liofilizada do açaí pode se tornar uma
146 alternativa para a administração de antioxidantes em dietas para organismos aquáticos,
147 pois possui capacidade de estimular o sistema de defesas antioxidantes endógeno e
148 exógeno, combatendo os efeitos do estresse oxidativo (Gordon, 1996; Schauss, 2016).
149 Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar as respostas de defesas
150 antioxidantes e dano oxidativo durante a exposição à amônia no camarão *L. vannamei* e
151 a ação quimioprotetora da inclusão de *Euterpe oleracea* na dieta, com a finalidade de
152 melhorar a capacidade antioxidante e assim amenizar os mecanismos de toxicidade da
153 amônia e o dano oxidativo neste crustáceo.

154

155 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

156 **2.1. Local e instalações**

157 O estudo foi realizado na Estação Marinha de Aquicultura (EMA) do Instituto de
158 Oceanografia (IO) da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, localizado na praia
159 do Cassino, Rio Grande, RS, Brasil.

160

161 **2.2. Material biológico e desenho experimental**

162 Camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* com peso médio (± 1 erro
163 padrão) inicial de $0,97 \pm 0,03$ g foram transferidos para 6 tanques circulares de polietileno
164 com volume útil de 220 litros cada, dispostos em 2 tratamentos em triplicata, contendo
165 110 camarões por tanque. O sistema de água era semi-estático, com aeração constante e
166 salinidade de 25 ppt. Os tratamentos foram designados por duas dietas experimentais:
167 dieta controle, sem inclusão do fruto do açaí liofilizado; e dieta com 10% de inclusão de
168 açaí (P/P), baseado no trabalho de Silva (2018) na mesma espécie.

169 Os camarões foram alimentados durante 35 dias duas vezes ao dia. Após esse
170 período, 240 camarões com peso médio de $3,87 \pm 0,04$ g, foram distribuídos entre 24
171 caixas com volume útil de 40 litros, representando um sistema fatorial de 2 (dieta com e
172 sem açaí) x 4 (total de concentrações de amônia testada) em triplicata, contendo 10
173 camarões por caixa, e expostos durante 96 h a quatro concentrações sub-letais de amônia
174 (0,01-controle; 0,26; 0,48 e 0,91 mg NH₃-N L⁻¹), baseadas a partir no nível de segurança

175 de 0,16 mg NH₃-N L⁻¹ em salinidade 25 para juvenis de *L. vannamei* (Lin & Chen, 2001).
176 As proporções de amônia não ionizada (NH₃) foram calculadas a partir da concentração
177 de amônia total, com base nas equações de Colt (2002). Estas soluções foram preparadas
178 a partir de uma solução estoque de cloreto de amônia (NH₄Cl) (250 mg/L) e diluídas até
179 a concentração de amônia não ionizada desejada, sendo pipetadas diretamente na água.
180 Para a manutenção das respectivas concentrações, o volume útil (100%) das caixas foi
181 renovado diariamente e as soluções de cloreto de amônia (NH₄Cl) adicionadas
182 novamente. Sempre que as soluções eram adicionadas, coletas de água de todos os
183 tratamentos eram realizadas para análises de amônia total e posterior cálculo de amônia
184 não ionizada, a fim de se determinar as concentrações reais de amônia não ionizada nos
185 diferentes tratamentos. Logo, as concentrações de amônia não ionizada apresentadas
186 neste estudo foram as concentrações reais efetivamente medidas.

187

188 **2.3. Análise da qualidade da água**

189 Durante o fornecimento das dietas experimentais foram mensurados diariamente, o
190 oxigênio dissolvido e a temperatura através de um oxímetro digital multiparâmetros
191 (YSI[®]-550A), pH com o um pHmêtro digital (Alfakit, AT 315 SP), amônia total (N-AT)
192 (NH₃ + NH₄⁺) e nitrito (N-NO₂⁻) (UNESCO, 1983). Semanalmente, foram feitas análises
193 de alcalinidade (APHA, 1998) e salinidade (Refratômetro Alfakit). Cerca de 80% do
194 volume total de cada tanque era trocado quando as concentrações de amônia total
195 ultrapassavam 1 mg/L (representando aproximadamente 0,04 mg NH₃-N L⁻¹) assim como
196 fezes e restos de ração sinfonados.

197 Durante as 96 h de exposição ao NH₄Cl, a salinidade foi mantida em 25 ppt, tendo o
198 oxigênio dissolvido, temperatura, pH, amônia total (N-AT) e não ionizada (NH₃) aferidos
199 diariamente.

200

201 **2.4. Preparo das rações**

202 As dietas experimentais foram elaboradas de forma isoprotéica e isoenergética,
203 com teor proteico de 35% de proteína bruta e 9% de lipídios (Tabela 1). Foram formuladas
204 duas dietas, uma sem inclusão de açaí (controle) e outra com inclusão do fruto do açaí
205 liofilizado (10% P/P). Em função do alto teor de lipídios, carboidratos e fibras, presente
206 na polpa liofilizada do açaí (Schauss, 2016), para o balanceamento energético entre as
207 rações, na dieta com inclusão de açaí foi necessário retirar parte dos carboidratos e óleo

208 de peixe em relação à dieta controle. O açaí *E. oleracea* utilizado na ração foi obtido da
 209 Empresa Amazônica Comércio de Açaí Liofilizado e Exportação LTDA, localizada em
 210 Belém - PA, Brasil.

211

212 Tabela 1. Formulação e composição proximal das dietas experimentais

<i>Ingredientes (%)</i>	<i>Dietas</i>	
	<i>Controle</i>	<i>Açaí</i>
Farinha de peixe ^a	28,50	28,50
Farelo de soja	23,90	21,90
Levedura de cerveja	5,00	5,00
Amido de milho	21,60	18,84
Farelo de trigo	5,60	5,60
Óleo de peixe ^b	4,90	0,66
Mistura mineral e vitamínica ^c	1,00	1,00
Colesterol	0,50	0,50
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	2,00	2,00
Celulose	7,00	6,00
Polpa de açaí liofilizado	0,00	10,00
<i>Composição proximal (%)</i>		
Matéria Seca	97,16	96,79
Proteína Bruta	35,39	35,73
Extrato Etéreo	9,46	9,23
Cinza	10,36	10,54
Fibra Bruta	5,45	5,30
ENN ^d	39,34	39,20
Energia Bruta (kj g ⁻¹) ^e	16,05	15,99

213 ^a Valores analisados da Farinha de Peixe (como % da matéria seca): 93,59 de matéria seca; 71,46
 214 de proteína bruta; 4,47 de lipídios; 16,28 de cinza; 0,71 de fibra bruta. Empresa (RS, Brasil).

215 ^b Campestre Ind. E Com. De Oleos Vegetais Ltda (São Paulo, SP, Brasil).

216 ^c Premix M. Cassab, SP, Brasil: Vit. A (500000 UI kg⁻¹), Vit. D3 (250000 UI kg⁻¹), Vit. E (5000
 217 mg kg⁻¹), Vit. K3 (500 mg kg⁻¹), Vit. B1 (1000 mg kg⁻¹), Vit. B2 (1000 mg kg⁻¹), Vit. B6 (1000
 218 mg kg⁻¹) Vit. B12 (2000 mcg kg⁻¹), niacin (2500 mg kg⁻¹), panteonato de cálcio (4000 mg kg⁻¹),
 219 ácido fólico (500 mg kg⁻¹), biotina (10 mg kg⁻¹), Vit. C (10000 mg kg⁻¹). Colina (100000mg kg⁻¹),
 220 inositol (1000 mg kg⁻¹). Elementos traços: selênio (30 mg kg⁻¹), ferro (5000 mg kg⁻¹), cobre (5000
 221 mg kg⁻¹), manganês (5000 mg kg⁻¹), zinco (9000 mg kg⁻¹), cobalto (50 mg kg⁻¹), iodo (200 mg kg⁻¹).

222 ^d Extrativo não nitrogenado: Calculado por diferença (100 – proteína bruta – extrato etéreo – cinza
 223 – fibra bruta).

224 ^e Energia bruta (kj g⁻¹ dieta) = (% proteína bruta x 16,7) + (% extrato etéreo x 37,7) + (% ENN x
 225 16,7).

226

227 2.5. Análises proximal da ração e do músculo do camarão

228 A análise da matéria seca (MS) foi realizada dispondo as amostras de rações e
 229 músculo em estufa a 102 °C por 5 h. Na análise de cinzas (MM), as amostras sofreram
 230 uma pré-calcinação e posteriormente foram levadas à mufla a 600 °C durante 5 h (AOAC,
 231

232 1999). A análise de proteína bruta (PB), segundo a metodologia de Kjeldahl, foi realizada
233 após a digestão da amostra e destilação do nitrogênio, multiplicando-se o resultado por
234 6,25. O extrato etéreo (EE) foi avaliado com o uso do método de extração a frio (Bligh &
235 Dyer, 1959). Para a análise da fibra bruta (FB) foi utilizada a digestão ácida e básica da
236 amostra por 30 min em cada digestão, sendo o valor de FB obtida por diferença (Silva &
237 Queiroz, 2009).

238

239 **2.6. Avaliação do desempenho zootécnico**

240 Para avaliar o desempenho zootécnico, ao final do experimento, foram analisados
241 os seguintes parâmetros:

242 1. Ganho de peso (GP) = peso final – peso inicial

243 2. Taxa de crescimento específico (TCE) = $[(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{ dias de}$
244 $\text{criação}] \times 100$

245 3. Conversão alimentar aparente (CAA) = ração fornecida / ganho de peso

246 4. Taxa de eficiência proteica (TEP) = ganho de peso (g) / proteína ingerida (g)

247 5. Sobrevivência (%) = $(\text{quantidade final de animais} / \text{quantidade inicial dos animais}) \times$
248 100 .

249

250 **2.7. Análises bioquímicas**

251 **2.7.1. Homogeneização das amostras**

252 Ao final das 96 h, os camarões foram eutanasiados em nitrogênio líquido para a
253 coleta dos órgãos. Após a dissecação, o hepatopâncreas, brânquias e músculo foram
254 pesados e homogeneizados (1:5 P/V) em solução tampão para crustáceos contendo Tris-
255 base (20 mM), EDTA (1 mM), MgCl₂ (0,05 mM), sacarose (5 mM), e KCl (1 mM), todos
256 dissolvidos em água destilada, com o pH ajustado em 7,2 sem inibidores de proteases.
257 Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20000 x g, por 30 minutos, a temperatura
258 de 4 °C, e os sobrenadantes reservados para as análises. A determinação do conteúdo total
259 de proteínas foi realizada pelo método do Biureto (550 nm) em um leitor de microplacas
260 (BioTek LX 800) utilizando-se o Kit de Proteínas Totais Doles (Amado et al., 2009).

261

262 **2.7.2. Polifenóis e flavonóides**

263 O conteúdo de polifenóis totais foi mensurado de acordo com Dias et al. (2013).
264 Foram adicionados em microplaca transparente 25 µl do extrato do tecido, 625 µl de

265 Folin-Ciocalteu 0,1 M, e após 5 min adicionou-se 500 µl de Na₂CO₃ 7,5% (P/V). Uma
266 curva padrão foi preparada com quercetina previamente diluída em metanol 100%. As
267 amostras foram incubadas por 60 min no escuro em temperatura ambiente e lidas em
268 absorvância a 740 nm. O conteúdo de polifenóis foi expresso em mg de polifenóis por g
269 de tecido.

270 Para a análise de flavonóides, seguiu-se o protocolo descrito por Gajula et al.
271 (2009). Em microplacas transparentes foram adicionadas 160 µl de extrato de cada tecido
272 em duplicata, 110 µl de metanol e 80 µl de AlCl₃ 5% (P/V). Assim como para os
273 polifenóis, uma curva de quercitina também foi preparada. Em seguida, incubou-se a
274 microplaca no escuro por 30 min a temperatura ambiente. A absorvância (450 nm) foi lida
275 em espectrofluorímetro (Biotek Synergy HT). Os dados foram expressados em mg de
276 flavonoides por g de tecido.

277

278 **2.7.3. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)**

279 A capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) foi determinada
280 através da detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas amostras de tecido
281 tratados ou não com um gerador de radicais peroxil, segundo metodologia descrita por
282 Amado et al. (2009). Foram adicionados à microplacas brancas 10 µl de tecido (seis poços
283 por amostra), previamente diluídos para 2 mg de proteína mL⁻¹ com tampão de
284 homogeneização, 127,5 µl de tampão de reação (pH 7.2, 30 mM HEPES, 200 mM, KCl,
285 e 1 mM MgCl₂), 7,5 µl de solução ABAP (dicloreto de 2,2-azobis (2
286 metilpropionamidina) a 20 µM (em três dos seis poços), e 10 µl de H₂DCF-DA (2',7'
287 diacetato de diclorofluoresceína) a 40 µM (nos seis poços). Os radicais peroxil gerados
288 pela decomposição térmica (37 °C) do ABAP reagem com o H₂DCF-DA formando um
289 composto fluorescente (DCF), detectado em comprimento de onda excitação/emissão de
290 485/520 nm. A medição ocorreu através de um leitor de microplacas (Biotek Synergy
291 HT), com leituras a cada 5 minutos durante 45 minutos. Os resultados foram quantificados
292 pela área relativa com e sem ABAP, sendo que quanto maior a área relativa, menor a
293 capacidade antioxidante (Amado et al., 2009).

294

295 **2.7.4. Peroxidação lipídica (TBARS)**

296 As análises de peroxidação lipídica foram realizadas através da concentração de
297 substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Oakes & Van Der, 2003). Em tubos

298 de ensaio foram adicionados às amostras (músculo: 100 µl; brânquias: 50 µl;
299 hepatopâncreas: 30 µl), 20 µl de solução de hidroxitolueno butilado (BHT a 67 µM), 150
300 µl de solução de ácido acético a 20%, 150 µL de solução de TBA (0,8%), 50 µL de água
301 destilada e 20 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS a 8,1%). As amostras foram aquecidas
302 a 95 °C durante 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 µL de água destilada e 500 µL
303 de n-butanol à solução final, sendo essa centrifugada a $3.000 \times g$ por 10 min a 15 °C. 150
304 µL do sobrenadante foram colocados em um leitor de microplacas para determinar a
305 fluorescência (excitação: 520 nm; 580 nm: emissão). Os resultados foram expressos em
306 nmol de tetrametoxipropano (TMP) (utilizado como padrão) por mg de tecido úmido.

307

308 **2.7.5. Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)**

309 A análise foi baseada segundo protocolo de Sedlak e Lindsay (1968). Foram
310 adicionados à 240 µL de amostra de tecido, previamente diluídos para 2 mg de
311 proteína mL⁻¹ com tampão de homogeneização, 28 µL de TCA (ácido tricloroacético
312 a 50% P/V). Após centrifugação para a precipitação das proteínas (20.000 x g, a 4 °C
313 durante 10 minutos), 100 µL do sobrenadante do extrato foram adicionados à
314 microplacas transparentes, juntamente com 200 µl de Tris-Base 0,4 M em pH 8,9 e 10
315 µl de DTNB (5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)). A microplaca foi incubada durante
316 15 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, foram efetuadas leituras de
317 absorvância a 405 nm. A concentração foi expressa em µmoles de GSH por mg de
318 proteína.

319

320 **2.7.6. Grupos sulfidrilas associados à proteínas (P-SH)**

321 Para a dosagem de P-SH (Sedlak & Lindsay, 1968), o pellet formado após a
322 centrifugação do GSH (Seção 2.7.5.) foi resuspendido com 240 µl de tampão de
323 homogeneização. Logo foram adicionados 100 µl do extrato, 160 µl de Tris-Base 0,2
324 M em pH 8,2 e 10 µl de DTNB, à microplacas transparentes e incubadas por 15
325 minutos em temperatura ambiente. As leituras foram feitas em espectrofluorímetro à
326 405 nm. A concentração foi expressa em µmoles de equivalentes à P-SH por mg de
327 proteína.

328

329 **2.7.7. Determinação da atividade da glutathiona-S-transferase (GST)**

330 A atividade da GST foi mensurada através da conjugação de 1 mM de GSH
331 com 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), na presença de 20 µl de extrato
332 das amostras homogeneizadas, gerando um complexo CDNB-GSH, segundo o
333 protocolo de Habig et al. (1974). Como meio de reação, utilizou-se um tampão de
334 fosfato de potássio (KH₂PO₄ – 0.05 M; pH 7,0), previamente aquecido em 25 °C em
335 banho maria. A absorvância (340 nm) do complexo foi lida em microplacas
336 transparentes utilizando espectrofluorímetro (Biotek Synergy HT).

337

338 **2.8. Análise estatística**

339 Para verificar a homogeneidade das variâncias dos diferentes tratamentos e a
340 normalidade da distribuição dos dados, foram aplicados os testes de Levene e Shapiro
341 Wilk, respectivamente ($\alpha= 0,05$). Após comprovados os pressupostos, todos os dados
342 foram submetidos à análise de variância modelo misto (ANOVA), sendo o fator aleatório
343 as diferentes caixas utilizadas e os fatores fixos as dietas e as concentrações de amônia
344 avaliadas. Foram também comparadas as respostas bioquímicas das duas dietas dentro da
345 mesma concentração de amônia. Seguidamente, para detectar possíveis diferenças entre
346 os tratamentos foi aplicado o teste de Newman-Keuls. O nível de significância foi
347 definido em 0,05 em todos os casos.

348

349 **3. RESULTADOS**

350 **3.1. Qualidade de água**

351 Durante o período de fornecimento às rações experimentais (dieta controle e dieta
352 açaí), as concentrações médias (± 1 erro padrão) de oxigênio dissolvido foram de $5,75 \pm$
353 $0,03$ e $5,79 \pm 0,03$ mg L⁻¹, a temperatura de $29,45 \pm 0,10$ °C e $28,94 \pm 0,06$ °C, o pH de
354 $8,00 \pm 0,03$ e $7,92 \pm 0,03$, a salinidade de $25,01 \pm 0,07$ e $24,95 \pm 0,08$, a alcalinidade de
355 $128,08 \pm 2,51$ e $131,40 \pm 2,59$ mg CaCO₃ L⁻¹, a amônia não ionizada de $0,05 \pm 0,00$ e
356 $0,04 \pm 0,00$ mg NH₃-N L⁻¹, e o nitrito de $0,04 \pm 0,01$ e $0,04 \pm 0,01$ mg N-NO₂ L⁻¹,
357 respectivamente. Estes parâmetros não apresentaram diferenças significativas entre si
358 ($P>0,05$).

359 Para os valores dos parâmetros de qualidade de água durante as 96 h de exposição à
360 amônia, as concentrações médias gerais (± 1 erro padrão) de oxigênio dissolvido,
361 temperatura e pH, se mantiveram em $5,83 \pm 0,03$ mg L⁻¹, $28,25 \pm 0,07$ °C e $8,25 \pm 0,00$,

362 respectivamente, entre todos os tratamentos de amônia, não havendo diferenças
363 significativas ($P>0,05$).

364

365 3.2. Desempenho zootécnico e composição proximal

366 As taxas de sobrevivência ao final dos 35 dias de cultivo foram de $98 \pm 0,02$ % para
367 ambos os tratamentos (Tabela 2). Durante o período de exposição à amônia, as taxas de
368 sobrevivência foram de $96,67 \pm 0,33$ % para as concentrações controle e $0,26$ mg $\text{NH}_3\text{-N}$
369 L^{-1} , e 100% para as concentrações de $0,48$ e $0,91$ mg $\text{NH}_3\text{-N}$ L^{-1} , não havendo diferença
370 entre os tratamentos ($P>0,05$).

371 Independente da dieta, não houve diferenças ($P>0,05$) entre o ganho de peso (TGP),
372 taxa de crescimento específico (TCE), conversão alimentar aparente (CAA) e taxa de
373 eficiência proteica (TEP), assim como para as análises de matéria seca, proteína e cinzas.
374 Os valores da deposição de lipídios realizadas a partir da composição proximal no
375 músculo do camarão *L. vannamei* foram maiores para os animais alimentados com a dieta
376 controle (DC) ($P<0,05$) (Tabela 2).

377

378 Tabela 2. Efeito da inclusão de *Euterpe olarecea* sobre os parâmetros de desempenho
379 zootécnico do *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas experimentais durante 35
380 dias e a composição proximal do músculo.

<i>Dietas</i>	Controle	Açaí
Peso Inicial (g)	$0,97 \pm 0,02$	$0,97 \pm 0,02$
Peso Final (g)	$4,00 \pm 0,04$	$3,95 \pm 0,04$
Ganho de Peso	$3,03 \pm 0,04$	$2,97 \pm 0,04$
TCE ¹	$4,06 \pm 0,03$	$4,00 \pm 0,03$
CAA ²	$1,27 \pm 0,02$	$1,34 \pm 0,02$
TEP ³	$2,29 \pm 0,03$	$2,17 \pm 0,03$
Sobrevivência (%)	$98,78 \pm 0,01$	$98,78 \pm 0,01$
<i>Composição proximal (%)</i>		
Matéria Seca	$23,81 \pm 0,36$	$24,06 \pm 0,42$
Proteína	$0,18 \pm 0,00$	$0,17 \pm 0,00$
Extrato Etéreo	$1,21 \pm 0,05^b$	$1,04 \pm 0,05^a$
Cinza	$5,62 \pm 0,11$	$5,58 \pm 0,13$

381 Valores expressos em média e ± 1 erro padrão. Letras diferentes na mesma linha
382 indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Newman-

383 Keuls ao nível de significância a 0,05. ¹Taxa de crescimento específico; ²Conversão
384 alimentar aparente; ³Taxa de eficiência proteica.

385

386 3.3. Análises Bioquímicas

387 3.3.1. Polifenóis e Flavonóides

388 Como esperado, as concentrações de polifenóis e flavonóides encontradas na dieta
389 com açaí (DA) foram maiores do que na dieta controle (DC) ($P < 0,05$). O hepatopâncreas
390 foi o único órgão que demonstrou um incremento do conteúdo de polifenóis e flavonóides
391 entre as dietas ($P < 0,05$). Brânquias e músculo não apresentaram diferenças significativas
392 ($P > 0,05$) (Tabela 3).

393 Tabela 3. Concentração de polifenóis (mg de polifenóis/g de tecido) (A) e flavonóides
394 (mg de flavonóides/g de tecido) (B) em ração, brânquias, hepatopâncreas e músculo de
395 *L. vannamei* alimentados com duas dietas experimentais durante 35 dias.

Dieta	Controle	Açaí
(A) Polifenóis		
Ração	0,33 ± 0,01 ^a	0,38 ± 0,01 ^b
Brânquias	0,17 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^a
Hepatopâncreas	0,2370 ± 0,0008 ^a	0,2401 ± 0,0012 ^b
Músculo	0,14 ± 0,004 ^a	0,15 ± 0,004 ^a
(B) Flavonóides		
Ração	7,58 ± 0,38 ^a	9,26 ± 0,09 ^b
Brânquias	4,58 ± 1,71 ^a	2,51 ± 0,98 ^a
Hepatopâncreas	96,75 ± 1,41 ^a	120,49 ± 5,65 ^b
Músculo	0,87 ± 0,12 ^a	0,91 ± 0,04 ^a

396 Valores expressos em média e ± 1 erro padrão (n = 6). Os dados foram submetidos a
397 análise de variância modelo misto (ANOVA), tendo como fator fixo as dietas e aleatório
398 as caixas, exceto para a análise da ração, a qual foi aplicado apenas a ANOVA de uma
399 via. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os
400 tratamentos de acordo com o teste de Newman-Keuls ao nível de significância a 0,05.

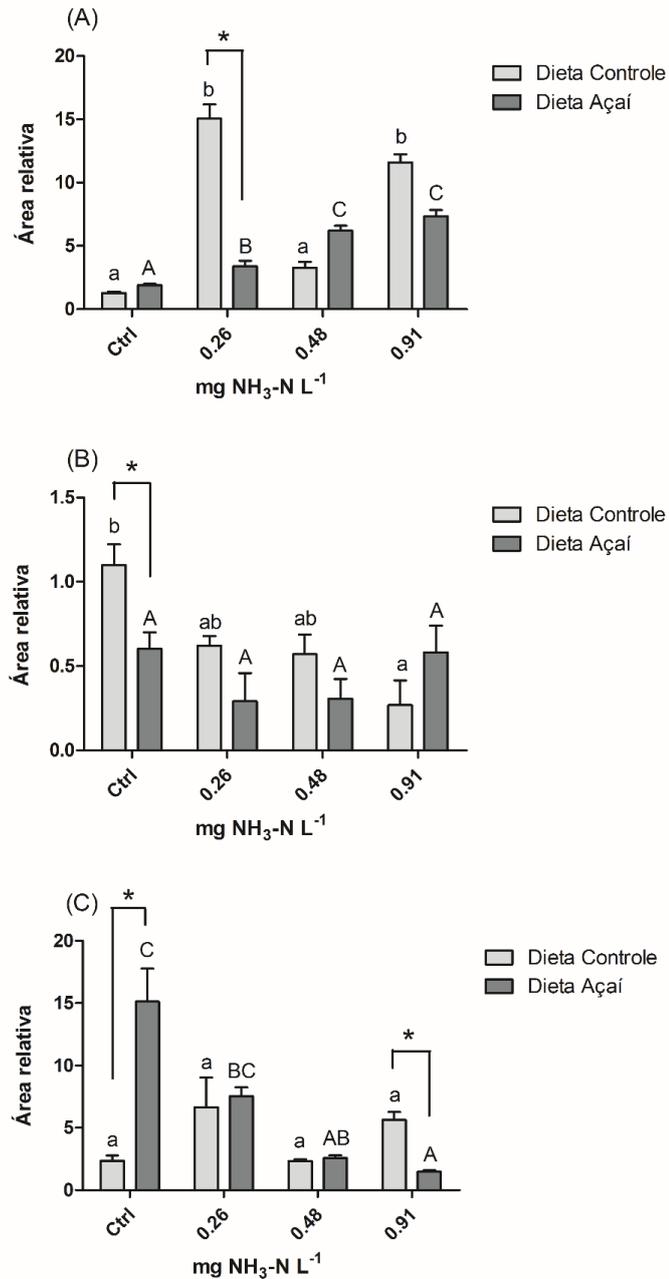
401 3.3.2. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)

402 Após a exposição à amônia, os animais alimentados com a DC sofreram uma
403 diminuição da ACAP (maior área relativa) das brânquias nas concentrações de 0,26 e 0,91
404 mg NH₃-N L⁻¹ em relação ao tratamento controle de amônia ($P < 0,05$). Assim como
405 observado na DC, os camarões da DA também apresentaram uma perda de capacidade

406 antioxidante conforme as concentrações de amônia aumentaram ($P < 0,05$). Dentro de cada
407 concentração de amônia houve diferença significativa entre as dietas apenas na
408 concentração de $0,26 \text{ mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$ ($P < 0,05$), onde os camarões alimentados com a DA
409 apresentaram maior capacidade antioxidante quando comparados com a DC (Fig. 1A).

410 No hepatopâncreas dos camarões alimentados com a DC houve um aumento
411 significativo da ACAP do tratamento controle de amônia para a concentração de $0,91 \text{ mg}$
412 $\text{NH}_3\text{-N L}^{-1}$ ($P < 0,05$). A ACAP dos camarões da DA permaneceu inalterada ao longo das
413 concentrações de amônia ($P > 0,05$). Dentro do tratamento controle a DA apresentou
414 maior capacidade antioxidante total que a DC ($P < 0,05$) (Fig. 1B).

415 Diferenças não foram observadas no músculo dos animais da DC ao longo das
416 concentrações de amônia ($P > 0,05$). Diferentemente do observado nas brânquias e no
417 hepatopâncreas dos camarões da DA, houve um aumento da competência antioxidante no
418 músculo nas concentrações de $0,48$ e $0,91 \text{ mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$ em relação ao tratamento
419 controle ($P < 0,05$). Dentro do tratamento controle a DC apresentou maior capacidade
420 antioxidante que a DA ($P < 0,05$), situação que se inverteu na concentração de $0,91 \text{ mg}$
421 $\text{NH}_3\text{-N L}^{-1}$ ($P < 0,05$) (Fig. 1C).



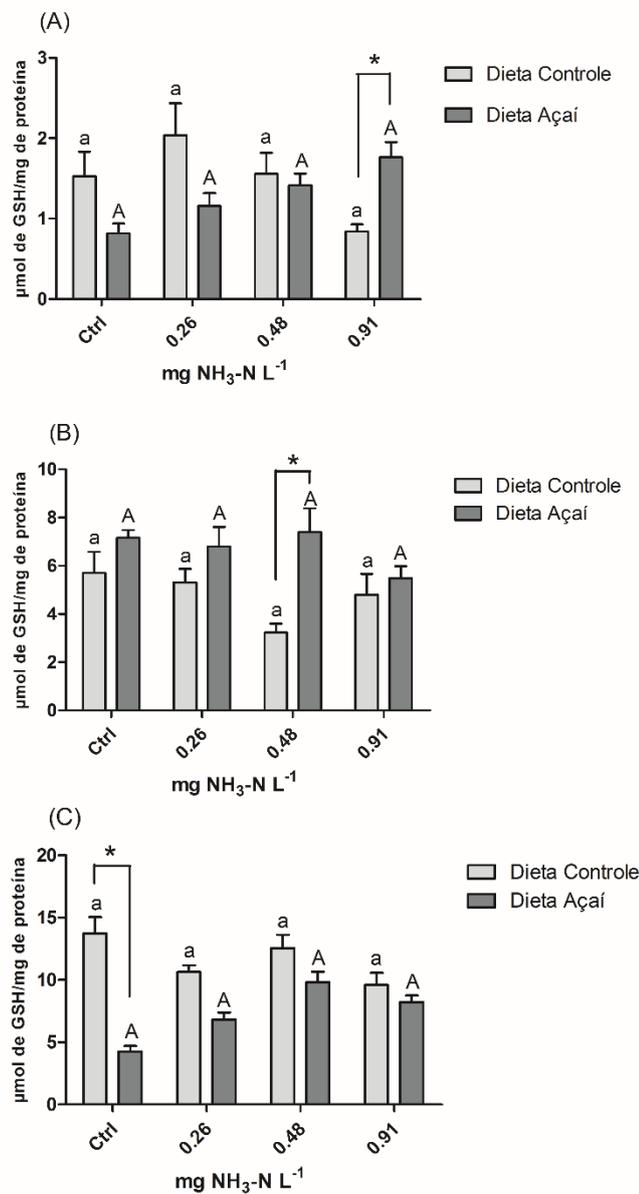
422

423 Figura 1. Valores da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (expressos em
 424 área relativa) em (A) brânquias, (B) hepatopâncreas e (C) músculo de *Litopenaeus*
 425 *vannamei* expostos a diferentes concentrações de amônia. Valores expressos em média e
 426 ± 1 erro padrão (n = 12). Letras diferentes na mesma dieta indicam diferenças
 427 significativas entre as concentrações de amônia dentro de cada tipo de dieta e (*) indicam
 428 diferenças entre as dietas dentro de cada concentração de amônia de acordo com o teste
 429 de Newman-Keuls ao nível de significância a 0,05.

430

431 3.3.3. Concentração da glutationa reduzida (GSH)

432 Independente do tratamento, não foram detectadas diferenças significativas nas
433 brânquias, hepatopâncreas e músculo, para as dietas DC e DA quando expostos às
434 concentrações de amônia ($P > 0,05$). Nas brânquias, na concentração de $0,91 \text{ mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$,
435 L^{-1} , os camarões que receberam açaí apresentaram maiores níveis de GSH em relação a
436 DC ($P < 0,05$) (Fig. 2A). O mesmo foi verificado no hepatopâncreas, só que na
437 concentração de $0,48 \text{ mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$ ($P < 0,05$) (Fig. 2B). Já no músculo, dentro do
438 tratamento controle, os camarões que consumiram a DC demonstraram níveis de GSH
439 mais elevados que a DA ($P < 0,05$) (Fig. 2C).



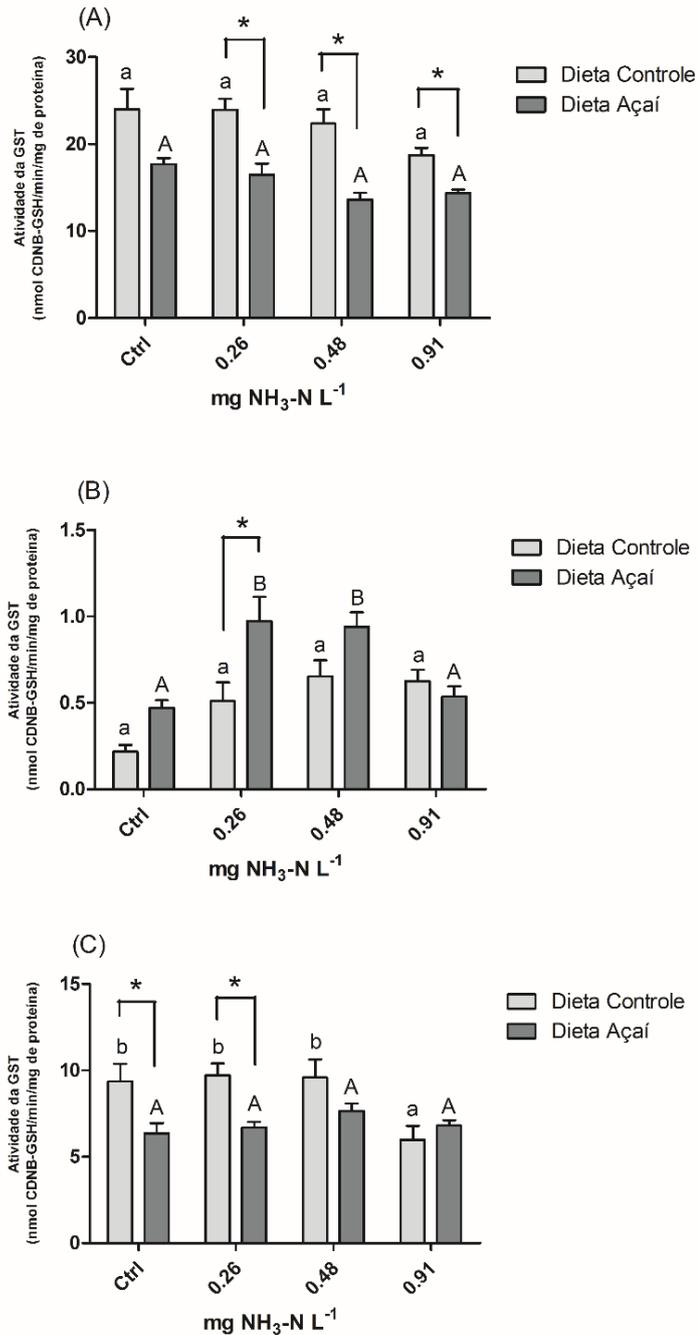
440

441 Figura 2. Concentração de glutathiona reduzida (GSH $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína) em (A)
442 brânquias, (B) hepatopâncreas e (C) músculo de *Litopenaeus vannamei* expostos a
443 diferentes concentrações de amônia. Valores expressos em média e ± 1 erro padrão (n =
444 12). Letras diferentes na mesma dieta indicam diferenças significativas entre as
445 concentrações de amônia dentro de cada tipo de dieta e (*) indicam diferenças entre as
446 dietas dentro de cada concentração de amônia de acordo com o teste de Newman-Keuls
447 ao nível de significância a 0,05.

448

449 **3.3.4. Atividade da glutathiona-S-transferase (GST)**

450 A atividade da GST nas brânquias não se alterou em ambas as dietas durante a
451 exposição à amônia ($P>0,05$). Dentro das concentrações de 0,26, 0,48 e 0,91 mg $\text{NH}_3\text{-N}$
452 L^{-1} , a atividade desta enzima foi mais elevada nos camarões que consumiram a DC em
453 relação a DA ($P<0,05$) (Fig. 3A). No hepatopâncreas houve um aumento da atividade da
454 GST nas concentrações de 0,26 e 0,48 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ L^{-1} dos animais da DA comparados ao
455 seu tratamento controle ($P<0,05$) (Fig. 3B). Este aumento só foi significativo dentro da
456 concentração de 0,26 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ L^{-1} , em relação aos animais tratados com a DC ($P<0,05$).
457 No músculo dos camarões da DC, houve uma diminuição significativa da atividade da
458 GST na concentração de 0,91 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ L^{-1} em relação ao tratamento controle ($P<0,05$),
459 enquanto que para os camarões que consumiram açaí permaneceu inalterada ($P>0,05$)
460 (Fig. 3C). Diferenças foram observadas entre as dietas no tratamento controle e 0,26 mg
461 $\text{NH}_3\text{-N}$ L^{-1} , onde camarões alimentados com açaí apresentaram uma redução da atividade
462 da GST no músculo ($P<0,05$).



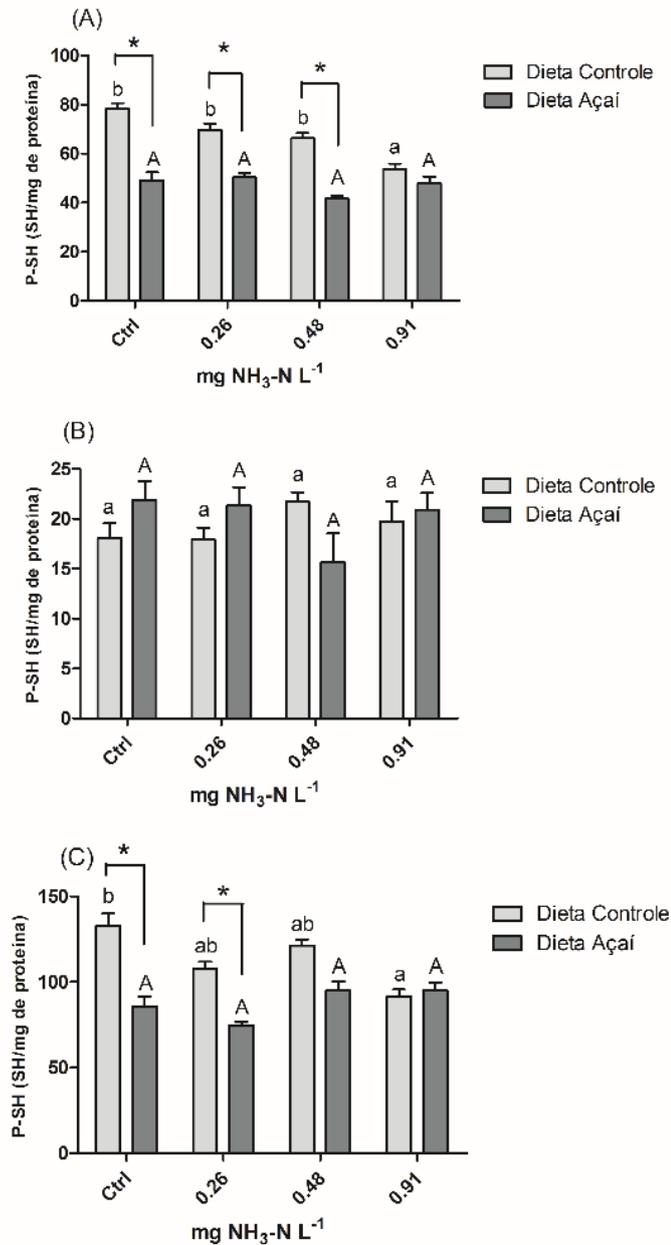
463

464 Figura 3. Atividade da glutationa-S-transferase (nmol CDNB-GSH/min/mg de proteína)
 465 em (A) brânquias, (B) hepatopâncreas e (C) músculo de *Litopenaeus vannamei* expostos
 466 a diferentes concentrações de amônia. Valores expressos em média e ± 1 erro padrão (n =
 467 12). Letras diferentes na mesma dieta indicam diferenças significativas entre as
 468 concentrações de amônia dentro de cada tipo de dieta e (*) indicam diferenças entre as
 469 dietas dentro de cada concentração de amônia de acordo com o teste de Newman-Keuls
 470 ao nível de significância a 0,05.

471 **3.3.5. Concentração de grupos sulfidrilas associados à proteína (P-SH)**

472 Nas brânquias, a quantidade de grupos sulfidrilas dos camarões que consumiram a
473 DC, diminuiu significativamente na concentração de 0,91 mg NH₃-N L⁻¹ em relação ao
474 tratamento controle (P<0,05), implicando no aumento do dano proteico, uma vez que
475 menores os níveis de P-SH, mais oxidadas estão as proteínas. Ao analisar apenas os dados
476 dos camarões da DA, as concentrações dos grupos sulfidrilas não foram afetados durante
477 à exposição à amônia (P>0,05). Nos tratamentos controle, 0,26 e 0,48 mg NH₃-N L⁻¹, ao
478 se comparar as dietas, os camarões da DA apresentaram maior dano proteico em relação
479 a DC (P<0,05) (Fig. 4A). No hepatopâncreas, independente da dieta, não houve
480 diferenças dentro ou nas distintas concentrações de amônia (P>0,05) (Fig 4B).

481 Semelhantemente ao observado nas brânquias, no músculo dos animais da DC
482 houve um aumento do dano proteico na concentração de 0,91 mg NH₃-N L⁻¹ em relação
483 ao tratamento controle (P<0,05), e a quantidade de grupos sulfidrilas dos camarões da DA
484 não se alteraram conforme o aumento dos níveis de amônia (P>0,05). Diferenças entre as
485 dietas dentro das mesmas concentrações de amônia foram verificadas nos tratamentos
486 controle e 0,26 mg NH₃-N L⁻¹, onde os camarões da DA apresentaram maior dano
487 (P<0,05) (Fig. 4C).



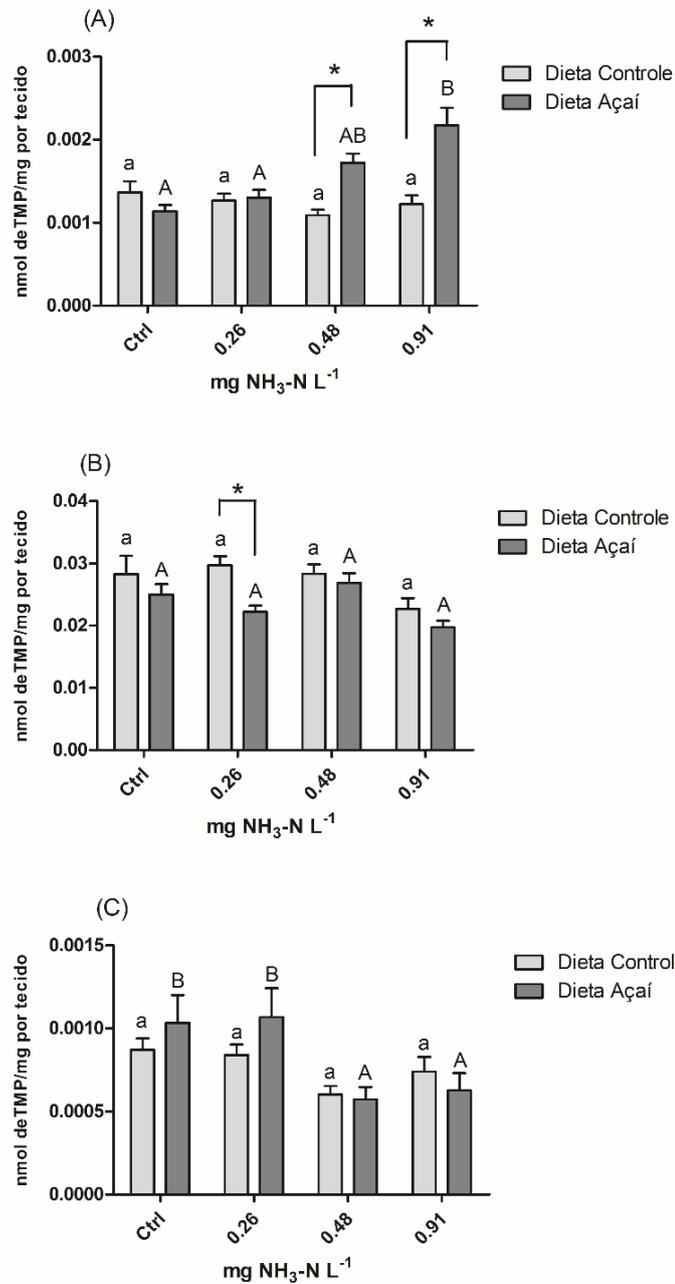
488

489 Figura 4. Concentração de grupos sulfidrilas associados à proteínas (SH/mg de proteína)
 490 em (A) brânquias, (B) hepatopâncreas e (C) músculo de *Litopenaeus vannamei* expostos
 491 a diferentes concentrações de amônia. Valores expressos em média e ± 1 erro padrão (n =
 492 12). Letras diferentes na mesma dieta indicam diferenças significativas entre as
 493 concentrações de amônia dentro de cada tipo de dieta e (*) indicam diferenças entre as
 494 dietas dentro de cada concentração de amônia de acordo com o teste de Newman-Keuls
 495 ao nível de significância a 0,05.

496 **3.3.6. Concentração de lipídios peroxidados (TBARS)**

497 Não foram observadas diferenças significativas de TBARS nas brânquias dos
498 camarões alimentados com a DC entre os níveis de amônia ($P > 0,05$). Verificou-se um
499 aumento de peroxidação lipídica na DA na concentração de $0,91 \text{ mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$ em
500 relação ao tratamento controle ($P < 0,05$). Diferenças entre as dietas ocorreram dentro das
501 concentrações de $0,48$ e $0,91 \text{ mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$, onde os camarões da DA apresentaram maior
502 peroxidação lipídica em relação a DC ($P < 0,05$) (Fig. 5A).

503 Os níveis de TBARS hepático mantiveram-se constantes durante a exposição às
504 diferentes concentrações de amônia para ambas as dietas ($P > 0,05$). Dentro da
505 concentração de $0,26 \text{ NH}_3\text{-N L}^{-1}$ os camarões da DA apresentaram menor dano lipídico
506 ($P < 0,05$) (Fig. 5B). O conteúdo de TBARS no músculo foi relativamente menor em
507 relação aos outros órgãos (menor que $0,0011 \text{ nmol deTMP/mg de tecido}$). Camarões
508 alimentados com DC não tiveram os níveis de TBARS alterados pelas concentrações de
509 amônia ($P > 0,05$), diferente do observado na DA, onde nas concentrações de $0,48$ e $0,91$
510 $\text{mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$ houve uma diminuição do dano lipídico em relação ao tratamento controle
511 da DA ($P < 0,05$) (Fig. 5C). Diferenças entre as dietas nas mesmas concentrações de
512 amônia não foram observadas ($P > 0,05$).



513

514 Figura 5. Conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol de TMP/mg por
 515 tecido) em (A) brânquias, (B) hepatopâncreas e (C) músculo de *Litopenaeus vannamei*
 516 expostos a diferentes concentrações de amônia. Valores expressos em média e ± 1 erro
 517 padrão (n = 12). Letras diferentes na mesma dieta indicam diferenças significativas entre
 518 as concentrações de amônia dentro de cada tipo de dieta e (*) indicam diferenças entre as
 519 dietas dentro de cada concentração de amônia de acordo com o teste de Newman-Keuls
 520 ao nível de significância a 0,05.

521 4. DISCUSSÃO

522 Durante o período de fornecimento das dietas experimentais, o oxigênio
523 dissolvido, temperatura, pH, alcalinidade e salinidade estiveram dentro dos
524 recomendados para a espécie (Van Wyk et al., 1999; Zhang, Zhang, Li, & Huang, 2006;
525 Ebeling, Timmons, & Bisogni, 2006). As concentrações de amônia não ionizada e nitrito
526 estiveram bem abaixo dos níveis de segurança para o cultivo do *L. vannamei* em
527 salinidade 25, estimados em 0,16 mg NH₃-N L⁻¹ e 15,2 mg N-NO₂ L⁻¹, respectivamente
528 (Lin & Chen, 2001, 2003).

529 Os resultados do desempenho zootécnico indicaram que o uso do açaí não foi um
530 fator limitante para o desenvolvimento do *L. vannamei*, uma vez que não houve diferenças
531 entre os parâmetros e a sobrevivência foi de 98% para ambos os tratamentos.

532 Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, Silva (2018) ao trabalhar com
533 diferentes níveis de inclusão de açaí na dieta do *L. vannamei*, também não observou
534 diferenças significativas no crescimento e sobrevivência destes animais. É importante
535 destacar que no presente trabalho, mesmo a inclusão do açaí na dieta sendo concomitante
536 com a diminuição de óleo de peixe utilizado na ração, o desempenho zootécnico não foi
537 afetado. Na aquicultura, cada vez mais se tem buscado alternativas para a substituição do
538 óleo de peixe por óleos de origem vegetal, uma vez que os estoques pesqueiros estão em
539 declínio. Logo, devido à alta concentração de ácidos graxos presentes na polpa do açaí,
540 este fruto pode se tornar uma possível alternativa para a substituição do óleo de peixe na
541 dieta de organismos aquáticos. Estudos prévios verificaram que a substituição do óleo de
542 peixe por até 100% de óleo de peixe estearina e óleo de palma na dieta do *L. vannamei*
543 também não afetou o peso final, crescimento ou sobrevivência (Soller, Roy & Davis,
544 2019).

545 Neste trabalho foi observado um menor conteúdo lipídico no músculo dos
546 camarões alimentados com açaí. Isto pode ser explicado em função da composição
547 nutricional do açaí, o qual é rico em compostos bioativos, como os polifenóis e
548 flavonóides, que auxiliam no processo de metabolismo dos lipídios, reduzindo a absorção
549 e acúmulo nos tecidos (Koo & Noh, 2007; Odendaal & Schauss, 2014; Ji et al., 2017).
550 Corvinas (*Larimichthys crocea*) ao serem alimentadas com chá de polifenóis tiveram o
551 conteúdo lipídico corporal e do fígado diminuídos (Ji et al., 2017). Essa diminuição no
552 acúmulo de lipídios nas células está relacionada com o fato de que extratos de plantas e
553 alimentos ricos em polifenóis podem atuar na inibição da lipase pancreática, reduzindo a
554 absorção intestinal de lipídios contidos na dieta (Koo & Noh, 2007; Gonzales et al., 2015),

555 ou por meio do favorecimento do processo de beta-oxidação de ácidos graxos, no qual,
556 antioxidantes como ácido lipóico podem contribuir (Shi et al., 2018).

557 Outro fator importante para a diminuição do conteúdo lipídico dos camarões que
558 consumiram açaí pode estar relacionado à capacidade da modulação do perfil lipídico por
559 este fruto, devido as suas altas concentrações de ácidos graxos insaturados (De Souza et
560 al., 2010). Dos monoinsaturados (60,6%), em torno de 56,2% são oleico e dos poli-
561 insaturados (13,3%), 12% são linoleico e 0,6% linolênico (Odendaal & Schauss, 2014).
562 Estes ácidos graxos participam ativamente no metabolismo oxidativo junto com o
563 colesterol, que quando utilizados em rotas metabólicas para produção de energia deixam
564 de se acumular nos tecidos, em função da diminuição da síntese e deposição de gordura
565 no organismo (Wei et al., 2013). Estudos com o uso do açaí na nutrição animal já
566 demonstram que o açaí favorece a diminuição do acúmulo de lipídios intracelulares em
567 adipócitos (Martino et al., 2016) e reduz os níveis de colesterol total e não-HDL em ratos
568 (De Souza et al., 2010).

569 Após 35 dias de cultivo, houve um incremento significativo no conteúdo de
570 polifenóis e flavonóides totais apenas no hepatopâncreas dos camarões alimentados com
571 a DA. Interessantemente, no grupo controle, o hepatopâncreas dos camarões que
572 receberam a ração com açaí foi o único órgão que apresentou capacidade antioxidante
573 significativamente maior que a DC, indicando que de fato, os compostos fenólicos foram
574 bem assimilados. A presença de compostos fenólicos pode auxiliar na interceptação de
575 ERO, como radicais peroxil, prevenindo danos lipídicos (Zamora & Hidalgo, 2016).
576 Semelhante ao observado neste trabalho, León et al. (2018), ao trabalharem com
577 quercitina, observaram que a exposição a este antioxidante durante 10 e 20 dias foram
578 suficientes para que os níveis de flavonóides totais no músculo e hepatopâncreas do
579 camarão *L. vannamei*, respectivamente, aumentassem de modo significativo. Apesar de
580 não ter ocorrido um aumento no conteúdo de polifenóis e flavonóides nas brânquias e
581 músculo, estes órgãos demonstraram respostas bioquímicas distintas ao serem expostos à
582 amônia.

583 No presente estudo, a capacidade antioxidante total contra peróxido radicais do
584 camarão *L. vannamei* foram maiores no hepatopâncreas, seguidos do músculo e
585 brânquias. Em comparação com o trabalho de Da Silva Martins, Artigas Flores, Porto,
586 Wasielesky Junior, & Monserrat (2015), valores similares para o *L. vannamei*, cultivados
587 em água clara, no hepatopâncreas e brânquias foram encontrados, exceto no músculo, o
588 qual apresentou menor capacidade antioxidante. No entanto, quando cultivados em

589 sistemas de bioflocos, os camarões apresentaram padrões de capacidade antioxidante
590 (hepatopâncreas > músculo > brânquias) similares ao deste trabalho. Isto pode estar
591 relacionado ao consumo dos bioflocos pelos camarões em sua alimentação (Buford,
592 Thompson, McIntosh, Bauman, & Pearson, 2004). Estudos apontam que o consumo de
593 bioflocos melhoram os aspectos nutricionais, por serem uma fonte natural rica em
594 compostos bioativos que auxiliam na manutenção do equilíbrio das funções fisiológicas,
595 aumentando o estado antioxidante do camarão (Wasielesky, Atwood, Stokes, & Browdy,
596 2006; Da Silva Martins et al., 2015). Embora o açaí tenha sido incluso na dieta e não
597 esteja constantemente disponível na coluna da água como os bioflocos, ambos possuem
598 compostos bioativos que agiram de forma parecida na competência antioxidante nos
599 diferentes órgãos do *L. vannamei*.

600 O termo quimioprevenção está relacionado a substâncias químicas ou naturais que
601 auxiliam na minimização de doenças ou efeitos tóxicos. Neste estudo, um efeito
602 quimioprotetor pode ser demonstrado quando ao se comparar as dietas dentro da mesma
603 concentração de amônia, a ração com inclusão de açaí é capaz de amenizar
604 significativamente os danos oxidativos ou melhorar a capacidade antioxidante em relação
605 a dieta controle. No decorrer do estudo, nem sempre a presença do açaí demonstrou efeito
606 quimioprotetor, porém um destes efeitos está relacionado ao aumento da GST no
607 hepatopâncreas na concentração de 0,26 mg NH₃-N L⁻¹, favorecendo a conjugação e
608 detoxificação de subprodutos derivados da peroxidação lipídica. Além do mais, o efeito
609 combinado da inclusão do açaí com a amônia em determinados tratamentos apresentou
610 uma melhora dos sistemas de defesas antioxidantes dos camarões não agravando o dano
611 proteico nas brânquias e músculo e atenuando o dano lipídico no músculo.

612 quimioprotetor contra os efeitos tóxicos da amônia ao aumentar a GST
613 favorecendo a conjugação e detoxificação de subprodutos derivados da peroxidação
614 lipídica no hepatopâncreas na concentração de 0,26 mg NH₃-N L⁻¹. Além disso, o efeito
615 combinado apenas do açaí com a amônia demonstrou uma melhora dos sistemas de
616 defesas antioxidantes do *L. vannamei*, não agravando o dano proteico nas brânquias e
617 músculo e atenuando o dano lipídico no músculo

618 A determinação da capacidade antioxidante é importante para facilitar a
619 compreensão da resistência dos organismos à toxicidade causada pela geração de ERO
620 (Amado et al., 2009). Porém, ao se analisar respostas de um organismo ao estresse
621 oxidativo, é importante levar em consideração que a capacidade antioxidante e a

622 intensidade do dano oxidativo se comportam diferentemente em distintos órgãos
623 (Monserrat et al., 2008; Amado et al., 2009).

624 Nas brânquias, a diminuição da capacidade antioxidante após a exposição à
625 amônia foi semelhante em ambas as dietas. Apesar do açai ter aumentado
626 significativamente a ACAP em relação a DC na concentração de 0,26 mg NH₃-N L⁻¹, no
627 restante das concentrações de amônia as defesas antioxidantes não foram suficientes para
628 manter os níveis de ERO controlados, já que houve agravamento da peroxidação lipídica
629 nas concentrações de 0,48 e 0,91 mg NH₃-N L⁻¹ quando comparado a DC. Como as
630 brânquias estão em contato direto com água, sendo o principal local de absorção de
631 compostos tóxicos (Ale et al., 2018) e a exposição à amônia induz ao incremento do
632 consumo de oxigênio nos tecidos (Racotta & Hernández-Herrera, 2000; Barbieri, 2010)
633 podendo elevar a produção de ERO, isto explicaria a perda de competência antioxidante
634 com o aumento das concentrações de amônia. A ACAP do músculo dos camarões da DA
635 apresentou comportamento dose/resposta, ou seja, o aumento das concentrações de
636 amônia causou uma elevação da capacidade antioxidante, o que não foi verificado na DC,
637 semelhante ao encontrado por Maltez et al. (2017) no músculo de juvenis de linguado,
638 quando expostos à amônia.

639 A melhora dos sistemas de defesas antioxidantes são uma das estratégias de
640 adaptação de organismos aquáticos frente a condições adversas que favoreçam a produção
641 de ERO (Welker, Moreira, Campos, & Hermes-Lima, 2013). Todavia, quando produzida
642 em excesso, estas podem sobrecarregar a capacidade de defesa antioxidante dos
643 organismos, favorecendo a ocorrência de danos moleculares e/ou sinalização celular
644 (Jones, 2006).

645 A perda de competência antioxidante nas brânquias facilitou o aumento dos níveis
646 de peroxidação lipídica na concentração de 0,91 mg NH₃-N L⁻¹ dos animais da DA. Em
647 parte, a perda da capacidade de defesa do sistema antioxidante deve-se ao estresse
648 oxidativo causado pela exposição à amônia, deixando os organismos mais susceptíveis a
649 sofrerem dano (Maltez et al., 2017). Durante o processo de peroxidação lipídica, um dos
650 sub-produtos formados são os radicais peroxil, porém, o aumento da capacidade
651 antioxidante pode interferir neste processo, ao combater e interceptar estes radicais,
652 impedindo a propagação do processo da lipoperoxidação (Benzie, 1996). Ao contrário do
653 ocorrido nas brânquias, o aumento da capacidade antioxidante no músculo dos camarões
654 da DA, foi capaz de diminuir significativamente o conteúdo de TBARS nas concentrações
655 de 0,48 e 0,91 mg NH₃-N L⁻¹ apenas em relação ao tratamento controle e não entre as

656 dietas, sugerindo que a ação do açaí não foi quimioprotetora em relação a DC, porém
657 apresentou efeito benéfico aos camarões diminuindo o dano lipídico. Vale ressaltar que
658 para fins comerciais e de consumo, este resultado poderia implicar na melhora da
659 qualidade e das propriedades nutricionais do músculo, tendo em vista que este é o
660 principal produto final do processo produtivo, no entanto, seriam necessários mais
661 estudos, como por exemplo, organolépticos.

662 Além do aumento da ACAP, o baixo acúmulo de lipídios no músculo dos camarões
663 que consumiram açaí deixou este tecido menos vulnerável à oxidação (Ouraji et al., 2011).
664 Em resposta a exposição à amônia, camarões *L. vannamei* tiveram a atividade da SOD do
665 hepatopâncreas significativamente diminuída devido ao aumento de ERO, causando um
666 aumento da concentração de peroxidação lipídica neste tecido (Jia et al., 2015; Liang et
667 al., 2016). Diferente do encontrado por esses autores, verificou-se que a inclusão do açaí
668 na dieta aumentou significativamente a ACAP do hepatopâncreas, mostrando-se
669 suficiente para a manter os níveis de peroxidação lipídica, sem que houvesse o aumento
670 do dano lipídico em função das concentrações de amônia.

671 A glutathiona (GSH) é encontrada nas formas reduzidas (GSH) e oxidada (GSSG),
672 e constitui uma das primeiras linhas de defesa do organismo contra a produção excessiva
673 de ERO (Ventura-Lima et al., 2009), sendo um importante indicador da capacidade
674 antioxidante nos tecidos contra radicais peroxil (Wang et al., 2018). Neste trabalho, o
675 aumento significativo dos níveis de GSH nas brânquias dos camarões da DA em relação
676 a DC na concentração de 0,91 mg NH₃-N L⁻¹, sugere que a presença do açaí na dieta
677 estaria induzindo respostas antioxidantes ao estresse causado pela maior concentração de
678 amônia testada. Apesar de não ter sido significativo, a tendência do aumento da GSH no
679 músculo dos camarões da DA conforme aumentou-se as concentrações de amônia,
680 somada ao aumento da competência antioxidante no músculo dos camarões alimentados
681 com açaí, pode ter intensificado a diminuição da peroxidação lipídica nas concentrações
682 de 0,48 e 0,91 mg NH₃-N L⁻¹ nesta mesma dieta. No hepatopâncreas, a inclusão do açaí
683 na dieta influenciou diretamente no aumento dos níveis de GSH dentro da concentração
684 de 0,48 mg NH₃-N L⁻¹ comparado com a DC, corroborando com o estudo de Xu et al.
685 (2012), em que a suplementação de GSH na dieta do *L. vannamei* melhorou a resistência
686 à amônia, ao aumentar o conteúdo celular de GSH e SOD no hepatopâncreas e,
687 consequentemente, reduzindo o dano lipídico.

688 A GST pertence a uma família de enzimas detoxificantes que atuam na
689 biotransformação e detoxificação de xenobióticos e aldeídos produzidos por meio da

690 peroxidação lipídica (Huber, Almeida & Fátima, 2008). Deste modo, a atividade GST e o
691 conteúdo de TBARS nos órgãos podem apresentar uma relação inversamente
692 proporcional (Lushchak et al., 2005), uma vez que algumas GSTs catalisam a degradação
693 de hidroperóxidos orgânicos (Halliweel & Gutteridge 2007). Nas brânquias, o açaí
694 promoveu uma queda significativa da atividade da GST em todas as concentrações de
695 amônia em relação a DC, porém em ambas as dietas ao decorrer das concentrações de
696 amônia a atividade da GST não foi alterada. Pinto et al. (2016), também não verificaram
697 diferenças na atividade da GST nas brânquias de *Macrobrachium amazonicum* expostos
698 a 0,9 e 2,0 mmol L⁻¹ N-AT. No músculo, diferentemente da DC, o açaí atuou na
699 manutenção da GST, o que provavelmente reforça os resultados encontrados no conteúdo
700 de TBARS para ambos órgãos. Diferentemente do observado neste trabalho, camarões da
701 espécie *Macrobrachium nipponens* ao serem alimentados com suplemento de vitamina
702 C, tiveram a atividade da GST do músculo aumentada de acordo com a elevação das
703 concentrações de amônia (Wang, Wang, Wang, Wang, & Sun, 2005). De modo geral, a
704 atividade da GST no hepatopâncreas, foi bem menor quando comparado as brânquias e
705 músculo, corroborando com os resultados encontrados por Da Silva Martins et al. (2015),
706 evidenciando o quanto este órgão demonstra possuir baixa capacidade de detoxificação
707 por meio de reações de fase II. Entretanto, foi o único órgão que apresentou um aumento
708 significativo da atividade da GST nos camarões alimentados com DA na concentração de
709 0,26 mg NH₃-N L⁻¹ em relação a DC, o que estaria reforçando o fato dos teores de TBARS
710 no hepatopâncreas terem diminuído significativamente nesta mesma concentração em
711 comparação a DC, toda vez que a GST catalisa a detoxificação de subprodutos derivados
712 da peroxidação lipídica.

713 A determinação do conteúdo de radicais sulfidrilas funciona como um
714 biomarcador de oxidação proteica em condições de estresse (De Souza et al., 2010). No
715 fígado e músculo do peixe *Perccottus gleni*, após submetidos a condição de hipóxia,
716 houve diminuição significativa do conteúdo de grupos sulfidrilas, caracterizando uma
717 condição de estresse oxidativo (Lushchak & Bagnyukova, 2007). Na presente
718 investigação, diferenças só foram encontradas nas brânquias e músculo, sendo que a
719 amônia favoreceu um ambiente redox pró-oxidante nos camarões alimentados com a DC,
720 induzindo ao dano proteico nestes órgãos. No tratamento controle, em ambos os órgãos,
721 o açaí promoveu naturalmente um estado mais oxidado, entretanto não se diferiu
722 estatisticamente no decorrer das diferentes concentrações de amônia. De fato, a presença
723 do açaí foi um fator limitante neste resultado. Uma hipótese, é que ação pró-oxidante do

724 açáí está relacionada a grande quantidade e diversidade de moléculas antioxidantes
725 presentes neste fruto, as quais, ao serem absorvidas e metabolizadas podem gerar
726 condições pró-oxidantes, assim como observado por Kütter, Monserrat, Santos & Tesser
727 (2013), nas maiores doses de ácido lipóico administrado via injeção intraperitoneal no
728 pampo *Trachinotus marginatus*.

729 **5. CONCLUSÃO**

730 Os resultados obtidos indicam que a inclusão do açáí na dieta do camarão *L.*
731 *vannamei* não afeta os parâmetros zootécnicos, e que a exposição à diferentes
732 concentrações de amônia durante 96 h foi capaz de induzir a alterações nos parâmetros
733 de estresse oxidativo nas brânquias e músculo em ambas as dietas. A presença do açáí na
734 dieta agiu como agente quimioprotetor contra os efeitos tóxicos da amônia ao aumentar
735 a GST favorecendo a conjugação e detoxificação de subprodutos derivados da
736 peroxidação lipídica no hepatopâncreas na concentração de 0,26 mg NH₃-N L⁻¹. Além
737 disso, o efeito combinado apenas do açáí com a amônia demonstrou uma melhora dos
738 sistemas de defesas antioxidantes do *L. vannamei*, não agravando o dano proteico nas
739 brânquias e músculo e atenuando o dano lipídico no músculo, tornando-se então uma
740 estratégia para minimizar o estresse oxidativo causado pela amônia, situação frequente
741 durante o cultivo desta espécie.

742 Futuras pesquisas histopatológicas podem ser realizadas com o intuito de verificar
743 possíveis alterações em brânquias, vistos os danos oxidativos causados em função da
744 exposição à amônia, observados neste trabalho. Também se considera importante estudar
745 a substituição do óleo de peixe pelo uso do açáí em dietas para organismos aquáticos, e
746 como o açáí pode atuar na modulação do perfil lipídico e na melhora da preservação das
747 características organolépticas *post mortem*.

748

749 **Agradecimentos**

750 Colombo, G.M., foi apoiada pela CAPES (2017-2019) durante sua pós-graduação em
751 Aquicultura na FURG. J. M. Monserrat, W. Wasielesky e M. B. Tesser recebem bolsas de
752 pesquisa em produtividade da agência brasileira CNPq (processos número PQ 308539 /
753 2016-8, PQ 310993 / 2013-0, e PQ 304119 / 2017-2, respectivamente).

754

755 **REFERÊNCIAS**

756 Ale, A., Bacchetta, C., Rossi, A. S., Galdopórpora, J., Desimone, M. F., Fernando, R., ...
757 & Cazenave, J. (2018). Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: Metal
758 accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects.
759 *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 976-984.
760 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.072>

761 Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R.,
762 ... & Monserrat, J. M. (2009). A method to measure total antioxidant capacity
763 against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate
764 microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*, 407, 2115-2123.
765 [10.1016/j.scitotenv.2008.11.038](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038)

766 Amado, L. L., Garcia, M. L., Pereira, T. C., Yunes, J. S., Bogo, M. R., & Monserrat, J. M.
767 (2011). Chemoprotection of lipoic acid against microcystin-induced toxicosis in
768 common carp (*Cyprinus carpio*, Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and*
769 *Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154, 146-153.
770 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.04.007>

771 AOAC International. (1999). Official methods of analysis of the Association of Official
772 Analytical Chemists (16th ed). Washington: 114p.

773 APHA (American Public Health Association). (1998). Standard methods for the
774 examination of water and wastewater. 20st edition. Washington, DC: 1193p.

775 Aquino, J. D. S., Soares, J. K. B., Magnani, M., Stamford, T. C. M., Mascarenhas, R. D.
776 J., Tavares, R. L., & Stamford, T. L. M. (2015). Effects of dietary Brazilian palm
777 oil (*Mauritia flexuosa* L.) on cholesterol profile and Vitamin A and E status of rats.
778 *Molecules*, 20, 9054-9070. [10.3390/molecules20059054](https://doi.org/10.3390/molecules20059054)

779 Baldizan, G., Oviedo, M., Michelangeli, C., & Vargas, R. E. (2010). Effects of peach palm
780 oil on performance, serum lipoproteins and haemostasis in broilers. *British poultry*
781 *Science*, 51, 784-790. [10.1080/00071668.2010.526925](https://doi.org/10.1080/00071668.2010.526925).

782 Barbieri, E. (2010). Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*)
783 (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture*, 306, 329-
784 333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.009>

785 Benzie, I. F. F. (1996). Lipid peroxidation: a review of causes, consequences,
786 measurement and dietary influences. *International Journal of Food Sciences and*
787 *Nutrition*, 47, 233-261. [10.3109/09637489609012586](https://doi.org/10.3109/09637489609012586)

788 Bligh, E. G.; Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification.
789 *Canadian Journal Biochemistry Physiological*, 27, 911-917.
790 <https://doi.org/10.1139/o59-099>

791 Bonomo, L. F., Silva, D. N., Boasquivis, P. F., Paiva, F. A., da Costa Guerra, J. F., Martins,
792 T. A. F., ... & Oliveira, R. P. (2014). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates
793 oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect
794 mechanisms. *PloS One*, 9, e89933. 10.1371/journal.pone.0089933

795 Burford, M. A., Thompson, P. J., McIntosh, R. P., Bauman, R. H., & Pearson, D. C.
796 (2004). The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus*
797 *vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture*, 232,
798 525-537. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00541-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00541-6)

799 Campos, B. R., Furtado, P. S., D'Incao, F., Poersch, L., & Wasielesky, W. (2015). The
800 chronic toxicity of ammonia, nitrite and nitrate on juvenile *Farfantepenaeus*
801 *brasiliensis* (CRUSTACEA: DECAPODA). *Boletim Instituto de Pesca*, 41, 261–
802 269. 10.1080/10454438.2014.882216

803 Colt J. (2002). List of spreadsheets prepared as a complement. Available at:
804 <http://www.fisheries.org/afs/hatchery.html> In: Wedemeyer GA (2nd ed.), Fish
805 hatchery management. American Fisheries Society.

806 Cordeiro, V. D. S. C., de Bem, G. F., da Costa, C. A., Santos, I. B., de Carvalho, L. C. R.
807 M., Ognibene, D. T., ... & Resende, A. C. (2018). *Euterpe oleracea* Mart. seed
808 extract protects against renal injury in diabetic and spontaneously hypertensive
809 rats: role of inflammation and oxidative stress. *European Journal of Nutrition*, 57,
810 817-832. 10.1007/s00394-016-1371-1

811 Da Costa, C. A., de Oliveira, P. R. B., de Bem, G. F., de Cavalho, L. C. R. M., Ognibene,
812 D.T., da Silva, A. F. E., ... & Resende, A. C. (2012). *Euterpe oleracea* Mart.-
813 derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural
814 changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn-*
815 *Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385, 1199-1209. 10.1007/s00210-
816 012-0798-z

817 Da Silva Martins, Á. C., Artigas Flores, J., Porto, C., Romano, L. A., Wasielesky Junior,
818 W., Caldas, S. S., ... & Monserrat, J. M. (2018). Antioxidant effects of
819 nanoencapsulated lipoic acid in tissues and on the immune condition in
820 haemolymph of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).
821 *Aquaculture Nutrition*, 24, 1255-1262. <https://doi.org/10.1111/anu.12663>

- 822 Da Silva Martins, Á. C., Artigas Flores, J., Porto, C., Wasielesky Junior, W., & Monserrat,
823 J. M. (2015). Antioxidant and oxidative damage responses in different organs of
824 Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) reared in a biofloc
825 technology system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, *48*, 279-
826 288. <https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1041240>
- 827 Da Silva Menezes, E. M., Torres, A. T., & Srur, A. U. S. (2008). Valor nutricional da polpa
828 de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amazonica*, *38*, 311-316.
829 10.1590/S0044-59672008000200014
- 830 Da Silva, T. V. N., Barbas, L. A. L., Torres, M. F., Sampaio, L. A., & Monserrat, J. M.
831 (2017). Lipid peroxidation and antioxidant capacity in *Peckoltia oligospila*
832 (Günther, 1864) submitted to transport under different concentration of dissolved
833 oxygen. *Aquaculture*, *481*, 72-78. 10.1016/j.aquaculture.2017.08.024
- 834 De Souza, M. O., Silva, M., Silva, M. E., de Paula Oliveira, R., & Pedrosa, M. L. (2010).
835 Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves
836 biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*, *26*,
837 804-810. 10.1016/j.nut.2009.09.007
- 838 Dias, A. L., Rozet, E., Larondelle, Y., Hubert, P., Rogez, H., & Quetin-Leclercq, J. (2013).
839 Development and validation of an UHPLC-LTQ-Orbitrap MS method for non-
840 anthocyanin flavonoids quantification in *Euterpe oleracea* juice. *Analytical and*
841 *Bioanalytical Chemistry*, *405*, 9235-9249. 10.1007/s00216-013-7325-z
- 842 Ding, Z., Kong, Y., Zhang, Y., Li, J., Cao, F., Zhou, J., & Ye, J. (2017). Effect of feeding
843 frequency on growth, body composition, antioxidant status and mRNA expression
844 of immunodependent genes before or after ammonia-N stress in juvenile oriental
845 river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Fish & Shellfish Immunology*, *68*, 428-
846 434. 10.1016/j.fsi.2017.07.045
- 847 Dos Santos, A. B., Pereira, M. L. A., de Oliveira Silva, H. G., de Jesus Pereira, T. C.,
848 Ribeiro, L. S. O., Azevêdo, J. A. G., ... & Barreto, F. O. (2016). Feeding behavior
849 of lambs fed diets containing peach palm meal. *Semina Ciências Agrárias*, *37*,
850 1629-1641. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n3p1629>
- 851 Dutra, F. M., Rönnau, M., Sponchiado, D., Forneck, S. C., Freire, C. A., & Ballester, E.
852 L. C. (2017). Histological alterations in gills of *Macrobrachium amazonicum*
853 juveniles exposed to ammonia and nitrite. *Aquatic Toxicology*, *187*, 115-123.
854 10.1016/j.aquatox.2017.04.003

855 Ebeling, J. M., Timmons, M. B., & Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the
856 stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of
857 ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257, 346–358.
858 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>

859 FAO (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018*. Roma: Organización
860 de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura.

861 Gajula, D., Verghese, M., Boateng, J., Walker, L. T., Shackelford, L., Mentreddy, S. R.,
862 & Cedric, S. (2009). Determination of total phenolics, flavonoids and antioxidant
863 and chemopreventive potential of Basil (*Ocimum basilicum* L. and *Ocimum*
864 *tenuiflorum* L.). *International Journal of Cancer Research*, 5, 130–143.
865 <https://doi.org/10.3923/ijcr.2009.130.143>

866 Gonzales, G. B., Smagghe, G., Grootaert, C., Zotti, M., Raes, K., & Camp, J. V. (2015).
867 Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism:
868 A sequential structure–activity/property relationship-based approach in the study
869 of bioavailability and bioactivity. *Drug Metabolism Reviews*, 47, 175–190.
870 [10.3109/03602532.2014.1003649](https://doi.org/10.3109/03602532.2014.1003649)

871 Gordon, M. H. (1996). Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Product*
872 *Reports*, 13, 265–273. doi:10.1039/np9961300265

873 Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first
874 enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*,
875 249, 7130–7139.

876 Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). Free radicals in biology and medicine (4th
877 ed.). New York, NY: Oxford University Press.

878 Han, S., Wang, B., Wang, M., Liu, Q., Zhao, W., & Wang, L. (2017). Effects of ammonia
879 and nitrite accumulation on the survival and growth performance of white shrimp
880 *Litopenaeus vannamei*. *Invertebrate Survival Journal*, 14, 221–232. ISSN 1824-
881 307X

882 Hertz, L., & Kala, G. (2007). Energy metabolism in brain cells: Effects of elevated
883 ammonia concentrations. *Metabolic Brain Disease*, 22, 199–218. [10.1007/s11011-](https://doi.org/10.1007/s11011-007-9068-z)
884 [007-9068-z](https://doi.org/10.1007/s11011-007-9068-z)

885 Huber, P. C., Almeida, W. P., & Fátima, Â. D. (2008). Glutathione e enzimas relacionadas:
886 papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31, 1170-
887 1179. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>

- 888 Ji, R., Li, Y., Li, X., Xiang, X., Li, Y., Zhu, S., ... & Ai, Q. (2017). Effects of dietary tea
889 polyphenols on growth, biochemical and antioxidant responses, fatty acid
890 composition and expression of lipid metabolism related genes of large yellow
891 croaker (*Larimichthys crocea*). *Aquaculture Research*, *49*, 1210-1218.
892 <https://doi.org/10.1111/are.13574>
- 893 Jia, X., Zhang, D., Wang, F., & Dong, S. (2015). Immune responses of *Litopenaeus*
894 *vannamei* to non-ionic ammonia stress: a comparative study on shrimps in
895 freshwater and seawater conditions. *Aquaculture Research*, *48*, 177-188.
896 <https://doi.org/10.1111/are.12872>
- 897 Jones, D. P. (2006). Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in
898 aging. *Rejuvenation Research*, *9*, 169-181. 10.1089/rej.2006.9.169
- 899 Kaur, N., & Singh, D. P. (2017). Deciphering the consumer behaviour facets of functional
900 foods: A literature review. *Appetite*, *112*, 167-187. 10.1016/j.appet.2017.01.033
- 901 Koo, S. I., & Noh, S. K. (2007). Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of
902 lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *The Journal of*
903 *Nutritional Biochemistry*, *18*, 179-183. 10.1016/j.jnutbio.2006.12.005
- 904 Kosenko, E.; Kaminsky, Y.; Kaminsky, A.; Valencia, M.; Lee, L.; Hermenegildo, C., &
905 Felipo, V. (1997). Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia
906 intoxication in rats. *Free Radical Research*, *27*, 637-644.
907 10.3109/10715769709097867
- 908 Kütter, M. T., Monserrat, J. M., Santos, R. A., & Tesser, M. B. (2013). Dose-response
909 effects of the antioxidant α -lipoic acid in the liver and brain of pompano
910 *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). *Journal of Applied Ichthyology*, *29*,
911 1123-1128. 10.1111/jai.12137
- 912 Kütter, M. T., Romano, L. A., Ventura-Lima, J., Tesser, M. B., & Monserrat, J. M. (2014).
913 Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-lipoic acid in aquatic
914 organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology &*
915 *Pharmacology*, *162*, 70-76. 10.1016/j.cbpc.2014.03.008
- 916 León, D. C. M., Wasiliesky Junior, W., & Monserrat, J. M. (2018). Quercetin influence in
917 water quality and biochemical responses of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared
918 in Biofloc Technology System. *Aquaculture Research*, *49*, 3569-3576.
919 <https://doi.org/10.1111/are.13823>
- 920 Liang, Z., Liu, R., Zhao, D., Wang, L., Sun, M., Wang, M., & Song, L. (2016). Ammonia
921 exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in

922 hepatopancreas of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish*
923 *Immunology*, 54, 523-528. 10.1016/j.fsi.2016.05.009

924 Lin, Y. C., & Chen, J. C. (2001). Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei*
925 Boone juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine*
926 *Biology and Ecology*, 259, 109-119. [https://doi.org/10.1016/S0022-](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00227-1)
927 0981(01)00227-1

928 Lin, Y. C., & Chen, J. C. (2003). Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei*
929 (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*. 224, 193-201.
930 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00220-5)

931 Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and
932 functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 4, 118–126.
933 10.4103/0973-7847.70902

934 Lushchak, V. I., & Bagnyukova, T. V. (2007). Hypoxia induces oxidative stress in tissues
935 of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*
936 *Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148, 390-397.
937 10.1016/j.cbpb.2007.07.007

938 Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Husak, V. V., Luzhna, L. I., Lushchak, V., & Storey,
939 K. B. (2005). Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive
940 response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The International Journal of*
941 *Biochemistry & Cell Biology*, 37, 1670-1680. 10.1016/j.biocel.2005.02.024

942 Maltez, L. C., Stringhetta, G. R., Enamorado, A. D., Okamoto, M. H., Romano, L. A.,
943 Monserrat, J. M., ... & Garcia, L. (2017). Ammonia exposure and subsequent
944 recovery trigger oxidative stress responses in juveniles of Brazilian flounder
945 *Paralichthys orbignyanus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43, 1747-1759.
946 10.1007/s10695-017-0406-8

947 Martino, H. S. D., dos Santos Dias, M. M., Noratto, G., Talcott, S., & Mertens-Talcott, S.
948 U. (2016). Anti-lipidaemic and anti-inflammatory effect of açai (*Euterpe oleracea*
949 Martius) polyphenols on 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Functional Foods*, 23,
950 432-443. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.037>

951 Mertens-Talcott, S. U., Rios, J., Jilma-Stohlawetz, P., Pacheco-Palencia, L. A., Meibohm,
952 B., Talcott, S. T., & Derendorf, H. (2008). Pharmacokinetics of anthocyanins and
953 antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp
954 (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *Journal of Agricultural*
955 *and Food Chemistry*. 56, 7796-7802. 10.1021/jf8007037

956 Monserrat, J. M., Lima, J. V., Ferreira, J. L. R., Acosta, D., Garcia, M. L., Ramos, P. B.,
957 ... & Amado, L. L. (2008). Modulation of antioxidant and detoxification responses
958 mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae).
959 *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*,
960 *148*, 287-292. [10.1016/j.cbpc.2008.06.011](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.06.011)

961 Oakes, K. D., & Van Der Kraak, G. J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting
962 oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to
963 pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, *63*, 447–463.
964 [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)

965 Odendaal, A. Y., & Schauss, A. G. (2014). Potent antioxidant and anti-inflammatory
966 flavonoids in the nutrient-rich Amazonian palm fruit, açai (*Euterpe* spp.). In
967 *Polyphenols in Human Health and Disease* (pp. 219-239). USA: Puyallup.

968 Ouraji, H., Kenari, A. A., Shabanpour, B., Shabani, A., Sodagar, M., Jafarpour, S. A., &
969 Ebrahimi, G. H. (2011). Growth, survival, and fatty acid composition of Indian
970 white shrimp *Fenneropenaeus indicus* (Milne Edwards) fed diets containing
971 different levels of vitamin E and lipid. *Aquaculture international*, *19*, 903-916.
972 [10.1007/s10499-010-9409-5](https://doi.org/10.1007/s10499-010-9409-5)

973 Pinto, M. R., Lucena, M. N., Faleiros, R. O., Almeida, E. A., McNamara, J. C., & Leone,
974 F. A. (2016). Effects of ammonia stress in the Amazon river shrimp
975 *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Aquatic Toxicology*,
976 *170*, 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.021>

977 Racotta, I. S., & Hernández-Herrera, R. (2000). Metabolic responses of the white shrimp,
978 *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and*
979 *Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *125*, 437-443.
980 [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00171-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00171-9)

981 Rocha, A. P. M., Carvalho, L. C. R. M., Sousa, M. A. V., Madeira, S. F., Sousa, P. J. C.,
982 Tano, T., Schini-Kerth, V. B., ... & de Moura, R. S. (2007). Endothelium-
983 dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart.(Acai) extracts in
984 mesenteric vascular bed of the rat. *Vascular Pharmacology*, *46*, 97-104.
985 [10.1016/j.vph.2006.08.411](https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.08.411)

986 Romano, N., & C. Zeng. (2012). Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to
987 aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions
988 with elevated ammonia exposure. *Aquaculture*, *334–337*: 12–23.
989 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.035>

- 990 Romano, N., & Zeng, C. (2013). Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod
991 crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological
992 consequences, and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, 21, 1-21.
993 <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>
- 994 Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Huang, D., Owens, ... & Shanbrom, E.
995 (2006). Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried
996 Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart.(acai). *Journal of Agricultural
997 and Food Chemistry*, 54, 8604-8610. 10.1021/jf0609779
- 998 Schauss, A.G. (2016). Advances in the study of the health benefits and mechanisms of
999 action of the pulp and seed of the Amazonian palm fruit, *Euterpe oleracea* Mart.,
1000 known as “Açaí”. In *Fruits, Vegetables, and Herbs* (pp. 179-220).
1001 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802972-5.00010-X>
- 1002 Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein
1003 sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25,
1004 192-205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- 1005 Septembre-Malaterre, A., Remize, F., & Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a
1006 source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive
1007 compounds during lactic fermentation. *Food Research International*, 104, 86-99.
1008 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.031>
- 1009 Shi, X. C., Jin, A., Sun, J., Tian, J. J., Ji, H., Chen, L. Q., & Du, Z. Y. (2018). The protein-
1010 sparing effect of α -lipoic acid in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*:
1011 Effects on lipolysis, fatty acid β -oxidation and protein synthesis. *British Journal
1012 of Nutrition*, 120, 977-987. 10.1017/S000711451800226X
- 1013 Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox
1014 Biology*, 4, 180–183. 10.1016/j.redox.2015.01.002
- 1015 Silva, D. J., & Queiroz, A. C. (2009). *Análise de Alimentos: Métodos Químicos e
1016 Biológicos* (3rd ed.). Viçosa, MG. 235p.
- 1017 Silva, S. M. (2018). Inclusão do açaí (*Euterpe Oleracea* MART. 1824) na dieta do
1018 camarão branco do Pacífico *Litopenaeus Vannamei* (BOONE, 1931): Efeito no
1019 desempenho zootécnico, coloração e repostas bioquímicas (Mestrado em
1020 Aquicultura). Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio
1021 Grande. Rio Grande, p. 57.
- 1022 Soller, F., Roy, L. A., & Davis, D. A. (2019). Replacement of fish oil in plant-based diets
1023 for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by stearine fish oil and palm oil.

- 1024 *Journal of the World Aquaculture Society*, 50,186-203.
1025 <https://doi.org/10.1111/jwas.12571>
- 1026 UNESCO. (1983). Chemical methods for use in marine environmental monitoring.
1027 Intergovernmental Oceanographic Commissiony (Manual and Guides 12). Paris,
1028 France: 53p.
- 1029 Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, C. R., Main, K. L., Mountain, J., & Scarpa,
1030 J. (1999). Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Ft. Pierce,
1031 FL: Harbor Branch Oceanographic Institution.
- 1032 Vasconcelos, S. M., Goulart, M. O., Moura, J. B., Manfredini, V., Benfato, M. S., &
1033 Kubota, L. T. (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes
1034 e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos
1035 para sua determinação. *Química. Nova*, 30, 1323–1338.
1036 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>
- 1037 Ventura-Lima, J., de Castro, M. R., Acosta, D., Fattorini, D., Regoli, F., de Carvalho, L.
1038 M., ... & Monserrat, J. M. (2009). Effects of arsenic (As) exposure on the
1039 antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comparative*
1040 *Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149, 538-543.
1041 10.1016/j.cbpc.2008.12.003
- 1042 Wang, W. N., Wang, A. L., Wang, Y., Wang, J., & Sun, R. Y. (2005). Effect of dietary
1043 vitamin C and ammonia concentration on the cellular defense response of
1044 *Macrobrachium nipponense*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36, 1-7.
1045 <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00124.x>
- 1046 Wang, X., Xu, W., Zhou, H., Zhang, Y., Gao, W., Zhang, W., & Mai, K. (2018). Reduced
1047 glutathione supplementation in practical diet improves the growth, anti-oxidative
1048 capacity, disease resistance and gut morphology of shrimp *Litopenaeus vannamei*.
1049 *Fish & Shellfish Immunology*, 73, 152-157. 10.1016/j.fsi.2017.11.043
- 1050 Wang, Y., Liang, J. P., Duan, Y. F., Niu, J., Wang, J., Huang, Z., & Lin, H. Z. (2016).
1051 Effects of dietary *Rhodiola rosea* on growth, body composition and antioxidant
1052 capacity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal conditions and
1053 combined stress of low-salinity and nitrite. *Aquaculture Nutrition*, 23, 548-559.
1054 <https://doi.org/10.1111/anu.12422>
- 1055 Wasielesky Jr, W., Atwood, H., Stokes, A., & Browdy, C. L. (2006). Effect of natural
1056 production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive

1057 culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258, 396-
1058 403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>

1059 Wasielesky, W. J., Poersch, L. H., Martins, T. G., & Miranda-Filho, K. C. (2017). Chronic
1060 effects of nitrogenous compounds on survival and growth of juvenile pink shrimp.
1061 *Brazilian Journal of Biology*, 77, 558-565. 10.1590/1519-6984.18415

1062 Wei, B., You, M. G., Ling, J. J., Wei, L. L., Wang, K., Li, W. W., ... & Ji, H. (2013).
1063 Regulation of antioxidant system, lipids and fatty acid β -oxidation contributes to
1064 the cardioprotective effect of sodium tanshinone IIA sulphonate in isoproterenol-
1065 induced myocardial infarction in rats. *Atherosclerosis*, 230, 148-156.
1066 10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.005

1067 Welker, A. F., Moreira, D. C., Campos, É. G., & Hermes-Lima, M. (2013). Role of redox
1068 metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen
1069 availability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular &*
1070 *Integrative Physiology*, 165, 384-404. 10.1016/j.cbpa.2013.04.003

1071 Wu, S. M., Liu, J. H., Shu, L. H., & Chen, C. H. (2015). Anti-oxidative responses of
1072 zebrafish (*Danio rerio*) gill, liver and brain tissues upon acute cold shock.
1073 *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative*
1074 *Physiology*, 187, 202-213. 10.1016/j.cbpa.2015.05.016

1075 Xu, D. D., Liu, X. H., Cao, J. M., Du, Z. Y., Huang, Y. H., Zhao, H. X., ... & Xie, C. X.
1076 2012. Dietary glutathione as an antioxidant improves resistance to ammonia
1077 exposure in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 43, 311-316.
1078 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02820.x>

1079 Zamora, R., & Hidalgo, F. J. (2016). The triple defensive barrier of phenolic compounds
1080 against the lipid oxidation-induced damage in food products. *Trends in Food*
1081 *Science and Technology*, 54, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.006>

1082 Zhang, M., Li, M., Wang, R., & Qian, Y. (2018). Effects of acute ammonia toxicity on
1083 oxidative stress, immune response and apoptosis of juvenile yellow catfish
1084 *Pelteobagrus fulvidraco* and the mitigation of exogenous taurine. *Fish & Shellfish*
1085 *Immunology*. 79, 313-320. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.036>

1086 Zhang, P., Zhang, X., Li, J., & Huang, G. (2006). The effects of body weight, temperature,
1087 salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg
1088 shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*, 256, 579-587.
1089 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.020>

1090 Zhang, Y., Ye, C., Wang, A., Zhu, X., Chen, C., Xian, J., & Sun, Z. (2015). Isolated and
1091 combined exposure to ammonia and nitrite in giant freshwater pawn
1092 (*Macrobrachium rosenbergii*): Effects on the oxidative stress, antioxidant
1093 enzymatic activities and apoptosis in haemocytes. *Ecotoxicology*, *24*, 1601-1610.
1094 10.1007/s10646-015-1477-x