

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

LUANA CAGOL

UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia alba* (ERVA-CIDREIRA) e *Aloysia triphylla* (ERVA-LUIZA) PARA *Macrobrachium rosenbergii*

Marechal Cândido Rondon

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

LUANA CAGOL

UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia alba* (ERVA-CIDREIRA) e *Aloysia triphylla* (ERVA-LUIZA) PARA *Macrobrachium rosenbergii*

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM ZOOTECNIA, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - área de concentração em Produção e Nutrição Animal.

Orientadora: Dra. Lilian Dena dos Santos
Co-Orientador: Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester

Marechal Cândido Rondon

2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Cagol, Luana

Utilização de óleos essenciais de *Lippia alba* (erva-cidreira) e *Aloysia triphylla* (erva-luiza) para *Macrobrachium rosenbergii* / Luana Cagol; orientador(a), Lilian Dena dos Santos; coorientador(a), Eduardo Luis Cupertino Ballester, 2020.

71 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2020.

1. aditivos naturais. 2. camarão de água doce. 3. parâmetros bioquímicos. I. Dena dos Santos, Lilian . II. Luis Cupertino Ballester, Eduardo. III. Título.

LUANA CAGOL

“Utilização de óleos essenciais de *Lippia alba* (erva-cidreira) e *Aloysia thiphylla* (erva-luiza) para *Macrobrachium rosenbergii*”

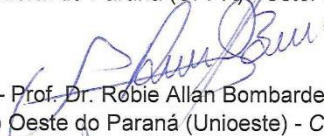
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de “Doutora em Zootecnia”, Área de Concentração “Produção e Nutrição Animal”, Linha de Pesquisa “Aqüicultura”, APROVADO(A) pela seguinte Banca Examinadora:



Presidente / Orientadora – Prof.^a Dr.^a Lilian Dena dos Santos
Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina



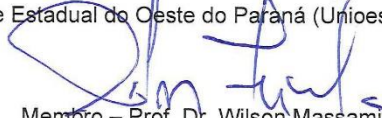
Membro / Coorientador – Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester
Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina



Membro – Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Toledo



Membro – Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Toledo



Membro – Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)



Membro – Prof.^a Dr.^a Lilian Carolina Rosa da Silva
Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina

Marechal Cândido Rondon, 2 de março de 2020.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e dado sinais em todos os caminhos que segui.

Aos meus pais Neri Cagol e Elenir Cagol, por apoiarem minhas decisões e pelo amor que depositam em mim.

Ao meu irmão Renan Cagol, pelos dias a fio de companhia e conselhos, pela amizade que temos, além do amor de irmãos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester, Prof^ª Dr^ª Lilian Dena dos Santos e ao Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto, pela orientação, oportunidade, dedicação e ensinamentos.

À UFPR - Setor Palotina, pela infraestrutura e pelos recursos oferecidos para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Izabel, Daiane, Cláudia, Ana, Amanda, Juvenal, Rosane, Rafael e às técnicas Marlise e Rafaela por todo apoio e companheirismo.

Aos Professores e ao secretário Paulo Henrique Morsch, do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Unioeste, *Campus* de Marechal Cândido Rondon, pelos ensinamentos, disponibilidade, atenção e prontidão.

Ao Laboratório de Carcinicultura, Laboratório de Qualidade de Água e Limnologia (LaQaL) e Laboratório de Nutrição Animal da UFPR. Também ao Laboratório de Fisiologia de Peixes (LAFIPE) da UFSM e Laboratório de Bioquímica da USP, pelo apoio dedicado.

Aos membros da banca, por aceitarem avaliar este trabalho e pelas sugestões.

Muito Obrigada!

UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia alba* (ERVA-CIDREIRA) e *Aloysia triphylla* (ERVA-LUIZA) PARA *Macrobrachium rosenbergii*

RESUMO

O uso de óleos essenciais já vem sendo avaliado para vários organismos aquáticos e tem demonstrado efeitos positivos em relação ao desempenho produtivo, eficiência de utilização dos nutrientes, aumento da taxa de crescimento, resistência ao estresse, imunidade e proteção contra patógenos, além de se destacarem por serem substâncias naturais e seguras para o meio ambiente e animais. Nesta tese, o objetivo foi avaliar a resposta dos parâmetros fisiológicos, zootécnicos e anestésicos da adição dos óleos essenciais de *Lippia alba* (OELA) e *Aloysia triphylla* (OEAT) para *Macrobrachium rosenbergii*. Especificamente, a tese está subdividida em quatro capítulos, iniciando, o primeiro capítulo, pela revisão bibliográfica onde são abordados temas relacionados à aquicultura em geral e o uso de óleos essenciais na carcinicultura, além da importância dos mesmos no estresse oxidativo. No segundo capítulo, foi avaliado o uso do óleo essencial de *L. alba* (0,0 mL - controle, 1,0 ou 2,0 mL de dieta OELA/kg; em triplicata, com 20 camarões/réplica) na dieta para juvenis de *M. rosenbergii*: seus efeitos sobre as enzimas antioxidantes e parâmetros de crescimento. No terceiro capítulo, avaliou-se o uso do óleo essencial de *A. triphylla* (0,0 mL - controle, 1,0, 2,0 e 3,0 mL de dieta OEAT/kg com cinco repetições, com 20 camarões/réplica), na dieta de juvenis de *M. rosenbergii*: efeitos sobre os parâmetros zootécnicos. No quarto capítulo, buscou-se compreender o efeito do potencial anestésico do óleo essencial de *A. triphylla* em pós-larvas de *M. rosenbergii*, no qual foram testadas seis concentrações de OEAT (em $\mu\text{L/L}$), em triplicata, com 10 animais/réplica, nomeadas da seguinte forma: controle positivo (0), controle negativo (volume de etanol (3600); correspondente a maior concentração utilizada para diluir o OE), 150, 225, 300 e 450, essas concentrações foram testadas em duas durezas de água (32 e 68 mg CaCO_3/L). No primeiro experimento, as doses de OELA contribuíram para diminuir a peroxidação lipídica. Além disso, a dose de 2,0 mL de OELA/kg de dieta contribuiu para aumentar as atividades das enzimas antioxidantes no hepatopâncreas. No segundo experimento, as doses de OEAT adicionadas à dieta não proporcionaram alterações nos parâmetros de desempenho zootécnico. Por fim, no terceiro experimento, o efeito do potencial anestésico de OEAT foi avaliado, sendo, portanto, observado que a exposição ao OE causou mortalidade em todas as concentrações utilizadas para a dureza de 32 mg CaCO_3/L . Apesar disso, pode-se recomendar, para curtos períodos de exposição, concentrações do OE inferiores a 150 $\mu\text{L/L}$. Os valores encontrados para CL_{10} e CL_{50} após os 30 minutos de recuperação foram, respectivamente (em $\mu\text{L/L}$): 195,34 e 325,43. Por outro lado, nos animais mantidos em uma dureza de 68 mg CaCO_3/L não foi observada qualquer mortalidade nas concentrações de OE testadas. A concentração de OEAT de 225 e 300 $\mu\text{L/L}$ foram eficazes na indução anestésica para pós-larvas de *M. rosenbergii* em uma dureza de 68 mg $\text{CaCO}_3.\text{L}^{-1}$, para evitar um possível efeito tóxico. Considerando os fatores bióticos e abióticos envolvidos nesta tese, pode-se concluir que a utilização de 2,0 ml de OELA na dieta de *M. rosenbergii* contribuiu diretamente para uma melhora da atividade antioxidante enzimática e, possivelmente, de forma indireta nos sistemas imune e de defesa contra patógenos. Por outro lado, as doses de OEAT adicionadas à dieta não causam efeito negativo no desempenho zootécnico, mas pesquisas relacionadas aos parâmetros bioquímicos e fisiológicos precisam ser realizadas.

Palavras-chave: aditivos naturais; camarão de água doce; parâmetros bioquímicos.

USE OF ESSENTIAL OILS FROM *Lippia alba* (CIDREIRA) AND *Aloysia triphylla* (ERVA-LUIZA) FOR *Macrobrachium rosenbergii*

ABSTRACT

The use of essential oils has already been evaluated for several aquatic organisms and has shown positive effects in relation to productive performance, efficiency in the use of nutrients, increased growth rate, resistance to stress, immunity and protection against pathogens, in addition to standing out for being natural and safe substances for the environment and animals. In this thesis, the aim was to evaluate the response of the physiological, zootechnical and anesthetic parameters of the addition of the essential oils of *Lippia alba* (OELA) and *Aloysia triphylla* (OEAT) to *Macrobrachium rosenbergii*. Specifically, the thesis is subdivided into four chapters, beginning, the first chapter, by the bibliographic review where topics related to aquaculture in general and the use of essential oils in prawn farming are addressed, in addition to their importance in oxidative stress. In the second chapter, the use of *L. alba* essential oil (0.0 - control, 1.0 or 2.0 mL of OELA diet/kg; in triplicate, with 20 prawns/replica) was evaluated in the diet for juveniles of *M. rosenbergii*: its effects on antioxidant enzymes and growth parameters. In the third chapter, the use of *A. triphylla* essential oil was evaluated (0.0 - control, 1.0, 2.0 and 3.0 mL of OEAT/kg diet with five repetitions, with 20 prawns/replica), in the diet of *M. rosenbergii* juveniles: effects on zootechnical parameters. In the fourth chapter, we sought to understand the effect of the anesthetic potential of the essential oil of *A. triphylla* in post-larvae of *M. rosenbergii*, in which six concentrations of OEAT (in $\mu\text{L/L}$) were tested, in triplicate, with 10 animals/replica, named as follows: positive control (0), negative control (volume of ethanol (3600); corresponding to the highest concentration used to dilute the OE), 150, 225, 300 and 450, these concentrations were tested in two hardnesses of water (32 and 68 mg CaCO_3/L). In the first experiment, OELA doses contributed to decrease lipid peroxidation. In addition, the dose of 2.0 mL of OELA/kg of diet contributed to increase the activities of antioxidant enzymes in the hepatopancreas. In the second experiment, the doses of OEAT added to the diet did not alter the parameters of zootechnical performance. Finally, in the third experiment, the effect of the anesthetic potential of OEAT was evaluated, and it was therefore observed that exposure to OE caused mortality in all concentrations used for the hardness of 32 mg CaCO_3/L . Despite this, OE concentrations below 150 $\mu\text{L/L}$ can be recommended for short exposure periods. The values found for CL10 and CL50 after 30 minutes of recovery were, respectively (in $\mu\text{L/L}$): 195.34 and 325.43. On the other hand, in animals kept at a hardness of 68 mg CaCO_3/L , no mortality was observed in the tested OE concentrations. The OEAT concentration of 225 and 300 $\mu\text{L/L}$ was effective in anesthetic induction for *M. rosenbergii* post-larvae in a hardness of 68 mg CaCO_3/L , to avoid a possible toxic effect. Considering the biotic and abiotic factors involved in this thesis, it can be concluded that the use of 2.0 ml of OELA in the diet of *M. rosenbergii* directly contributes to an improvement in the enzymatic antioxidant activity and, possibly, indirectly in the immune and defense against pathogens. On the other hand, the doses of OEAT added to the diet do not have a negative effect on zootechnical performance, but research related to biochemical and physiological parameters needs to be carried out.

Keywords: natural additives; freshwater prawn; biochemical parameters.

SUMÁRIO

1. Introdução	7
1.1 Objetivo geral	8
1.2 Objetivos específicos.....	8
2 Revisão	8
2.1 Aquicultura	8
2.2 Carcinicultura de água doce	9
2.3 Estresse oxidativo.....	11
2.3.1 Superóxido Dismutase – SOD.....	11
2.3.2 Catalase – CAT.....	12
2.3.3 Glutathiona Peroxidase - GPx	12
2.3.4 Glutathiona-S-Transferase - GST.....	13
2.3.5 Glutathiona Reduzida – GSH	13
2.4 Anestesia em crustáceos	13
2.5 Óleos essenciais.....	15
2.6 Referências	17
3 ÓLEO ESSENCIAL <i>Lippia alba</i> NA DIETA DE <i>Macrobrachium rosenbergii</i>: EFEITOS SOBRE AS ENZIMAS ANTIOXIDANTES E PARÂMETROS DE CRESCIMENTO	24
3.1 Introdução.....	26
3.2 Materiais e métodos.....	28
3.2.1 Material.....	28
3.2.2 Material vegetal e extração de óleo essencial.....	29
3.2.3 Camarões, desenho experimental e fabricação de dieta experimental.....	29
3.2.4 Parâmetros de desempenho	31
3.2.5 Coleta de amostras para análise bioquímica	31
3.2.6 Declaração de ética.....	32
3.2.7 Análises estatísticas	32
3.3 Resultados.....	33
3.3.1 Desempenho zootécnico	33
3.3.2 Análises bioquímicas.....	33
3.4 Discussão.....	34
3.5 Conclusão	37
3.6 Referências	37

4	ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Aloysia triphylla</i> NA DIETA DE <i>Macrobrachium rosenbergii</i>: EFEITOS SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO	44
4.1	Introdução	45
4.2	Material e métodos	46
4.2.1	Material vegetal e extração de óleo essencial	47
4.2.2	Animais e Delineamento Experimental	47
4.2.3	Parâmetros de desempenho	49
4.2.4	Declaração de ética	49
4.2.5	Análises estatísticas	49
4.3	Resultados	49
4.3.1	Desempenho zootécnico	49
4.4	Discussão	50
4.5	Conclusão	51
4.6	Referências	52
5	EFEITO DO POTENCIAL ANESTÉSICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Aloysia triphylla</i> EM PÓS-LARVAS DE <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	55
5.1	Introdução	57
5.2	Material e Métodos	59
5.2.1	Material vegetal e extração de óleo essencial dos testes 1 e 2	59
5.2.2	Animais e delineamento experimental dos testes 1 e 2	60
5.2.3	Indução anestésica, recuperação e taxa de mortalidade de pós-larvas de <i>M. rosenbergii</i> expostas a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>A. triphylla</i> (OEAT) e durezas da água	60
5.2.4	Declaração de ética	61
5.2.5	Análises estatísticas	61
5.3	Resultados	61
5.6	Discussão	7
5.7	Conclusão	9
5.8	Referências	10

1. Introdução

A produção de camarões de água doce em cativeiro apresenta progressivo crescimento, o qual é favorecido por algumas características como o menor tempo de maturação sexual das espécies, larvicultura mais simples, potencial produtivo compatível com pequenos sistemas agropecuários e maior resistência sanitária. Nestes aspectos, destaca-se a espécie *Macrobrachium rosenbergii* (gigante da Malásia) que atingiu produção anual média de 220.254 toneladas no ano de 2016, com perspectiva de crescimento em 8% ao ano na carcinicultura mundial (FAO, 2016; PAVADI et al., 2018).

Na produção de organismos aquáticos, as condições de cultivo, como altas densidades, deterioração da qualidade de água, encontros agonísticos, entre outros, podem causar estresse aos animais. O estresse é uma resposta resultante do manejo e pode ser definido como uma condição onde há um desequilíbrio entre concentrações elevadas de agentes pró-oxidantes sobre antioxidantes que resultam na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MATÉS et al., 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). As EROs podem ser radicais livres como o ânion superóxido ($O_2\cdot^-$) e hidroxila ($\cdot OH$) ou agentes oxidantes não radicais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARBOSA et al., 2010). Existem enzimas antioxidantes capazes de combater as EROs, sendo as principais a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona-S-transferase (GST), e os antioxidantes não-enzimáticos, como a glutaciona reduzida (GSH), sendo todas elas abundantes nos tecidos de organismos aquáticos (STOREY, 1996; BIANCHI; ANTUNES, 1999; VAN DER OOST et al., 2003; WENDELAAR BONGA, 2011).

Com o intuito de melhorar a eficiência econômica, o desempenho produtivo e o estado antioxidante dos animais aquáticos, muitos estudos têm investigado o potencial de antibióticos, agroquímicos e aditivos naturais e, nesse âmbito, ao se analisar as desvantagens no uso de produtos sintéticos, cresce o interesse no uso de produtos naturais (SHAKYA et al, 2015; AWAD; AWAAD, 2017). Dentre esses, os óleos essenciais também têm sido estudados, principalmente para utilização em condições de estresse ou como anestésicos, podendo ajudar a minimizar e evitar possíveis efeitos negativos (COYLE et al., 2005; MARICCHIOLO e GENOVESE, 2011). Dentro deste cenário, o interesse por aditivos derivados de plantas tem se intensificado nos últimos anos, e bons resultados para peixes já foram relatados com óleos essenciais, tais como óleo de orégano *Origanum heracleoticum* (ZHENG et al., 2009); extrato etanólico de chá verde (HWANG et al., 2013); gengibre (KANANI et al., 2014); óleo de *Aloysia triphylla* (ZEPPENFELD et al., 2016) e óleo de *Lippia alba* (SACCOL et al., 2013). E apesar

de escassos, já foram também relatados resultados para camarões com óleo de cravo-da-índia para *Penaeus semisulcatus* (SOLTANI et al., 2004) e *A. triphylla* e *L. alba* para *Litopenaeus vannamei* (PARODI et al., 2012).

Os óleos essenciais são considerados uma das mais importantes matérias-primas para a indústria alimentícia, farmacêutica e de perfumaria. Possuem peso molecular baixo, apresentam moléculas de natureza terpênica e bioativas e, ainda, são voláteis e lipofílicos (MORAIS, 2009; GOMES et al., 2011). Devido às suas diversas propriedades, a literatura científica ainda requer um maior número de estudos sobre os possíveis efeitos de óleos essenciais em crustáceos, principalmente, do organismo modelo desta tese, *M. rosenbergii*, pois até o momento não há dados sobre o efeito do uso de óleos essenciais sobre respostas zootécnicas e fisiológicas para esta espécie de camarão de água doce.

1.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta de parâmetros bioquímicos, zootécnicos e anestésicos à adição dos óleos essenciais de *Lippia alba* (OELA) e *Aloysia triphylla* (OEAT) para *Macrobrachium rosenbergii*.

1.2 Objetivos específicos

Avaliar o óleo essencial de *L. alba* (OELA) quanto ao efeito da suplementação dietária sobre os parâmetros bioquímicos e zootécnicos para juvenis de *M. rosenbergii*.

Avaliar o desempenho zootécnico em juvenis de *M. rosenbergii* alimentados com dietas suplementadas com diferentes doses de óleo essencial de *A. triphylla*.

Avaliar o efeito do potencial anestésico do óleo essencial de *A. triphylla* em pós-larvas de *M. rosenbergii*.

2 Revisão

2.1 Aquicultura

A população mundial atual é de cerca de nove bilhões de pessoas e isso tem levado a sérios problemas no sustento e fornecimento de alimento, o que tem se intensificado devido aos efeitos causados pelas alterações climáticas e degradação ambiental dos recursos naturais (FAO, 2018). Apesar da captura da produção pesqueira se manter estável desde o final dos anos 90, a aquicultura tem sido importante para suprir o contínuo crescimento no fornecimento de pescado para consumo humano e hoje representa 46,8% da produção mundial de pescado. Neste

mesmo cenário, houve um aumento médio anual do consumo de pescado (3,2%) o qual superou o crescimento da população (1,6%) e o de consumo de carne de animais terrestres (2,8%) (FAO, 2018). A produção global da aquicultura incluiu em toneladas: 54,1 milhões de peixes, 17,1 milhões de moluscos, 7,9 milhões de crustáceos e 938.500 de outros animais aquáticos (FAO, 2018).

A produção aquícola brasileira, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018) alcançou uma marca de 547,1 mil toneladas em 2017, sendo 88,7% proveniente da piscicultura, seguida de 7,5% da carcinicultura. Dados recentes da FAO mostram que o Brasil ocupa atualmente a 13ª posição em produção mundial da aquicultura (FAO, 2018). Além disso, nosso país apresenta características que favorecem esse crescimento no setor, principalmente devido aos seus aspectos climáticos, condições naturais e matriz energética, à sua extensão costeira de mais de 8.000 quilômetros e disponibilidade de água doce, representando aproximadamente 13% da água doce renovável do planeta (ROCHA et al., 2013).

Grande parte da população humana, cerca de 30%, sofre com problemas de saúde relacionados à má alimentação, resultando em desnutrição ou obesidade (TACON e METIAN, 2013). O pescado possui uma composição bromatológica que varia conforme espécie, tamanho, sexo e o estado nutricional (YARNPAKDEE et al., 2014), porém, é uma das proteínas animais de melhor qualidade, sendo fonte de aminoácidos essenciais, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, minerais e oligoelementos (SCHMIDT et al., 2015).

Ainda em relação aos benefícios das atividades aquícolas, Rocha (2012) cita que no Brasil a carcinicultura marinha gera 50 mil empregos diretos e indiretos em áreas carentes de oportunidades na região Nordeste. A piscicultura continental, a carcinicultura marinha e a malacocultura são os ramos mais desenvolvidos da aquicultura brasileira, baseadas principalmente em espécies exóticas, sendo praticadas em diversos locais e com diversas estratégias de produção. Por outro lado, a carcinicultura de água doce conta com empreendimentos comerciais, mas o número de iniciativas, atividades e pontos de cultivo é bastante reduzido (BRASIL, 2013).

2.2 Carcinicultura de água doce

O cenário mundial da carcinicultura de água doce, que tem como principal gênero o *Macrobrachium*, teve entre os anos de 1990 a 2000, um aumento no volume produzido de *Macrobrachium rosenbergii* que passou de 21.000 para 118.500 toneladas, crescimento

correspondente a 500% (FAO, 2002). Em 2005, ainda em contínuo crescimento, a carcinicultura de água doce teve uma produção de 410 mil toneladas, sendo as principais espécies cultivadas: *Macrobrachium rosenbergii* e *Macrobrachium nipponense*, movimentando cerca de US\$ 1,6 bilhão. A espécie *M. rosenbergii* teve uma produção de cerca de 205 mil toneladas no ano de 2005, tendo como principais produtores a China e a Índia (FAO, 2007).

Mundialmente, em relação aos crustáceos e moluscos de água doce, os números de produção se mantiveram relativamente estáveis desde 2010. Em 2016, a produção de *M. rosenbergii* foi de 230 mil toneladas e para *M. nipponense* foi de 270 mil toneladas (FAO, 2018). Os camarões são commodities altamente comercializados e representam o segundo principal grupo de espécies exportadas em termos de valor, ficando atrás apenas dos peixes marinhos e diádromos (FAO, 2018).

M. rosenbergii é a principal espécie de água doce cultivada no Brasil, estima-se que sua produção nos últimos anos atinja 100 toneladas/ano (FAO, 2018). A primeira descrição feita para *M. rosenbergii* foi por De Man (1879), como *Palaemon rosenbergii* e em 1950 foi reclassificado para o gênero *Macrobrachium* por Holthuis. A espécie se caracteriza pela ausência dos espinhos supraorbital e branquiostegal, mas apresenta o espinho hepático e palpo mandibular. Em relação à sua morfologia, é caracterizado por possuir rostro longo e curvado para cima, crista basal distintamente elevada, longa ou com a metade distal da margem superior nua e margem inferior com 8-14 dentes e telso ultrapassando a extremidade dos espinhos posteriores mais longos. *M. rosenbergii* é considerado a maior espécie de camarão de água doce, podendo chegar a 32 cm de comprimento e 500 g de massa corpórea (PINHEIRO e HEBLING, 1998).

Segundo Sampaio et al. (2010), nos últimos anos, a produção de camarões no mundo teve crescimento significativo, mas como consequência, aumentaram os problemas relacionados à poluição das águas e doenças devido ao despejo de efluentes sem tratamento. Dessa forma, na aquicultura em geral, tanto os procedimentos de manejo quanto àqueles desenvolvidos durante as pesquisas, tais como triagem, biometria e transporte podem estar associados a algum tipo de resposta de estresse agudo, a qual contribuirá para a diminuição do sistema de defesa, deixando o organismo mais vulnerável e suscetível a doenças e parasitas, levando então à redução da produtividade e maiores taxas de mortalidade (FERREIRA et al., 2011; WALKER et al., 2009). Daí surge a grande necessidade de pesquisas que busquem minimizar o estado de estresse durante o manejo.

2.3 Estresse oxidativo

Sob condições fisiológicas normais, uma produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) moderada é crucial para o bom funcionamento das células (AKBARIAN et al., 2016), porém, quando uma célula animal perde a sua homeostase entrando um estado de desequilíbrio entre as EROs, isso demonstra que o sistema de defesa antioxidante está comprometido e este efeito é denominado como estresse oxidativo (POLI et al., 2004).

A resposta ao estresse passa por três fases: síndrome geral da adaptação, resistência e exaustão. No início, é uma fase de alerta com uma resposta fisiológica rápida, na sequência, o animal tenta se adaptar e recuperar sua homeostase e em seguida, caso não consiga uma adaptação devido à duração ou intensidade do estresse, o animal entra em exaustão onde compromete a saúde ou até mesmo a sobrevivência do animal (BARTON E IWAMA, 1991; GERWICK et al., 1999; TORT, 2011).

Os antioxidantes são caracterizados como qualquer substância que, presente em concentrações inferiores que as do substrato oxidável, seja capaz de dificultar ou impossibilitar uma oxidação eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não- radicais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (BARBOSA et al., 2010). O sistema de defesa antioxidante pode combater as EROs com seus mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. A superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST) são as enzimas antioxidantes e a glutathione reduzida (GSH) como antioxidante não enzimático. O sistema antioxidante não enzimático é constituído principalmente pelos antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM), que desativam diretamente as EROs. Todos estes antioxidantes são abundantes em tecidos de organismos aquáticos (WENDELAAR BONGA, 2011; AKBARIAN et al., 2016).

Estudos para camarões revelam que temperaturas mais altas podem induzir maiores taxas de geração de ERO's, resultando em estresse oxidativo para *L. vannamei* criados a 33°C (SOUZA et al., 2016). Para *M. nipponense* há um melhor crescimento e menor estresse oxidativo à temperatura de 25°C (WANG et al., 2006).

2.3.1 Superóxido Dismutase – SOD

O radical superóxido é a primeira ERO formada pelo sistema de defesa. Entretanto, quando na presença de grande quantidade de EROs, sua atividade é reduzida, pois excede a

capacidade de remoção das EROs (PUERTO et al., 2010; WANG et al., 2015). Em condições fisiológicas normais, estima-se que 1 a 4% do total de oxigênio consumido durante o transporte de elétrons seja reduzido a superóxido, devido ao vazamento de elétrons nos complexos I e III da cadeia respiratória (LI et al., 2016).

A função da enzima SOD é catalisar a dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e está presente em três isoformas: citoplasmática, mitocondrial e extracelular (APEL e HIRT, 2004). O peróxido de hidrogênio será catalisado pela CAT ou GPx (RIBEIRO et al., 2005).

2.3.2 Catalase – CAT

A CAT degrada o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, uma das moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida a água, sendo assim, catalisa a dismutação de $2H_2O_2$ em O_2 e $2H_2O$. Na presença de Fe^{+2} , há a formação do radical hidroxil HO, por meio da reação de Fenton, que é altamente reativo e danoso. Esta enzima encontra-se no citoplasma, principalmente no peroxissomo de todos os tecidos animais e pode ser encontrada também nas mitocôndrias (CHAMPE; HARVEY, 1996; HALLIWELL, 1992), eritrócitos, fígado, baço e rins (OLIVEIRA E SCHOFFEN, 2010).

2.3.3 Glutathione Peroxidase - GPx

A GPx, assim como a CAT, reduz o peróxido de hidrogênio em água, resultando em duas moléculas de água e uma de glutathione oxidada (GSSG), tendo como substrato a GSH. A ação desta enzima depende da manutenção da relação entre GSH e glutathione oxidada, a qual é garantida pela ação da enzima glutathione redutase, que na presença de NADPH, transforma a GSSG em GSH (SIKKA, 2004). Sendo assim, a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos, protegendo a célula contra o estresse oxidativo. (OLIVEIRA, 2011).

As GPx possuem a atividade mais baixa em invertebrados quando comparados com vertebrados, porém, a atividade da CAT e da SOD são semelhantes, ou até mais elevadas, indicando importante participação na proteção antioxidante dos organismos aquáticos (LIVINGSTONE et al., 1993; REGOLI et al., 2002).

2.3.4 Glutathione-S-Transferase - GST

As GSTs são enzimas multifuncionais, importantes na desintoxicação da segunda fase de defesa antioxidante. Presentes em organismos procarióticos e também eucarióticos como peixes e mamíferos, sendo que nos eucarióticos são encontradas principalmente no fígado (GRÖNER ZIKOVÁ; KLOAS, 2015; POLIMANTI et al., 2012). Estão envolvidas em reações de conjugações com a presença da GSH, participam de transporte intracelular, auxiliam na manutenção do balanço oxidativo, na biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas e no controle de peroxidação lipídica (OGA; CARMARGO; BATISTUZZO, 2008; PAMPLONA, 2009).

A GST é conhecida pelo seu envolvimento na redução da glutathione, evitando danos às células, causados pela presença de xenobióticos (BRAZ-MOTA et al., 2015). A indução de GST em tecidos de peixes é conhecida por ser benéfica para o manejo de condições de estresse, por poluentes ou substâncias tóxicas, realizando um processo de desintoxicação (SAMANTA et al., 2014; VIEIRA et al., 2016).

2.3.5 Glutathione Reduzida – GSH

Tem como função proteger as células de substâncias tóxicas, o que ocorre por meio da conjugação de metabólitos, que inclui xenobióticos, resultando um intermediário menos tóxico e capaz de reduzir os danos nas células (MARAN et al., 2009). Sendo assim, é considerada um antioxidante intracelular que auxilia na desintoxicação e eliminação de EROs, mantendo o equilíbrio redox celular (ROCHETTE et al., 2013).

2.4 Anestesia em crustáceos

Nos últimos anos, os invertebrados têm recebido atenção principalmente, em função de um aumento na sua produção, da conscientização ambiental em relação à biodiversidade, da sua utilização em pesquisas biomédicas e da necessidade em se reduzir o estresse decorrente dos procedimentos de aquicultura. Assim, no caso dos crustáceos, alguns estudos reportaram a utilização de alguns anestésicos em diversos procedimentos, e também relacionando os potenciais anestésicos com variáveis biológicas e físico-químicas. Entre os anestésicos já utilizados, temos o MS-222, álcool isobutílico, lidocaína, cetamina ou xilazina (BROWN et al., 1996; GARDNER, 1997; OSWALD, 1997; FERRARO E PRESSACCO, 1996).

Em geral, os anestésicos sintéticos apresentam alto custo e efeitos adversos tanto nos animais quanto nos profissionais que os manipulam e para o meio ambiente. Desta forma, alguns pesquisadores têm apresentado alternativas naturais para utilização, como anestésicos em crustáceos. O eugenol, principal constituinte do óleo de cravo, apresentou respostas positivas quando da sua utilização em *Litopenaeus vannamei* (PARODI et al., 2012) e *Macrobrachium rosenbergii* (SAYDMOHAMMED E PAL, 2009). Devido ao comportamento territorialista e de canibalismo dos camarões, os quais também possuem rostros afiados e movimentação explosiva, é recomendado o uso de pequenas concentrações de anestésicos na água durante procedimentos de manejo (AKBARI et al., 2010). Durante o ciclo de produção de camarões, ocorrem diferentes procedimentos laboratoriais, envolvendo atividades de captura, biometrias, coleta de amostras, troca de tanques, além das flutuações dos parâmetros físicos e químicos da água, cujo manejo inadequado gera estresse (FERREIRA et al., 2011; WALKER et al., 2009). Em algumas ocasiões, submetem os animais à exposição ao ar e, na sequência, estes são reimersos novamente na água, ocasionando elevação do lactato e glicose na hemolinfa (BARRENTO et al., 2011).

Sendo assim, é importante encontrar anestésicos alternativos que sejam seguros e eficazes para peixes e crustáceos. Deve ser realizado um estudo para cada espécie, o seu limite de tolerância ao composto, bem como o procedimento mais adequado para a realização da indução anestésica. Em geral, tanto para peixes quanto para camarões, têm-se utilizado banhos de imersão, nos quais o anestésico pode ser diluído diretamente na água ou previamente em solvente orgânico (LEWBART e MOSLEY, 2012; SNEDDON, 2012). Desta forma, o anestésico será absorvido principalmente pelas brânquias, chegando ao sistema circulatório e bloqueando algumas ações reflexas. Ademais, a definição do tempo adequado ou circunstância para anestesia não são tão claras, por ser muito específica para cada espécie, requerendo-se mais estudos para uma melhor compreensão de todas essas interações (GRAHAM e IWAMA, 1990).

Para avaliação da eficiência do anestésico, é necessário determinar tempos de indução para sedação, anestesia e recuperação. Além disso, é importante a avaliação visual do comportamento, natação e reação a estímulos externos (ROSS e ROSS, 2008). A sedação é caracterizada pela diminuição da sensibilidade, quando o animal entra em um estado de tranquilidade. Por outro lado, quando ocorre a imobilização, inconsciência e analgesia (ZAHL et al., 2012) são características da anestesia. O efeito depende da dose anestésica empregada, tempo de exposição e fisiologia de cada espécie. Segundo Parodi et al., (2012), para camarões, são definidos dois estágios de anestesia: a) sedação, caracterizada pela perda parcial de

equilíbrio e presença de resposta a estímulos externos; e b) a anestesia, caracterizada pela perda total do equilíbrio, mas sem resposta a estímulos externos, ou diferença dos parâmetros de qualidade da água.

2.5 Óleos essenciais

Na aquicultura, as substâncias mais utilizadas, principalmente devido à pressão dos patógenos sobre o hospedeiro, são desinfetantes parasiticidas e antibióticos. Porém, a utilização desses compostos traz riscos à segurança alimentar dos consumidores (LOVE et al., 2011), além disso, pode ocasionar lesões tóxicas aos organismos aquáticos e efeitos deletérios sobre o ecossistema (TAVECHIO et al., 2009). Normalmente, estes produtos são altamente tóxicos e capazes de afetar microrganismos não alvos, aumentando assim, a degradação ambiental (RICO et al., 2012).

Nos dias atuais, tem-se buscado alternativas para prevenção e tratamento de enfermidades na aquicultura, havendo um crescimento do interesse pelo uso de produtos naturais em vez de produtos sintéticos, a fim de garantir maior segurança alimentar (SHAKYA et al., 2015; AWAD; AWAAD, 2017). A biodiversidade no Brasil é a maior do mundo, com cerca de 45 mil espécies de plantas superiores (entre 20 e 22% de todas as plantas existentes no mundo) (DUTRA et al., 2016). Sendo assim, há um interesse em produtos naturais terapêuticos como os óleos essenciais (OEs), os quais são compostos voláteis extraídos de plantas e são utilizados frequentemente na aromaterapia e descritos como produtos de grande potencial farmacológico, podendo ser obtidos através da extração de diferentes partes das plantas aromáticas, como folhas, flores e frutos (EDRIS, 2007). Comumente, os OE apresentam em sua composição os terpenos hidrocarbonetos, tais como álcoois, cetonas, aldeídos estéres e fenóis (SUTILI et al., 2017), os quais tem ganhado destaque em estudos na aquicultura e que visam comprovar sua eficácia como compostos capazes de auxiliar na promoção de crescimento e melhora nas respostas metabólicas dos peixes.

O órgão responsável pela regulamentação e comercialização das plantas medicinais com fins terapêuticos no Brasil é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). De acordo com a ANVISA, atualmente, há 66 plantas permitidas para esta finalidade, dentre elas, dentro da família Verbenacea, destacam-se as espécies *Lippia* e *Aloysia*. Estas duas espécies possuem atividade anti-inflamatória (DUTRA et al., 2016), antimicrobiana (AGUIAR et al., 2008), antioxidante (SILVA DAMASCENO et al., 2018) e analgésica (SIQUEIRA-LIMA et al., 2019). As mesmas já foram testadas em aquicultura devido ao potencial antimicrobiano e

antioxidante (MAJOLO et al., 2017; SOUZA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; PARODI, et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2017). As informações do uso de óleos essenciais e seus compostos para espécies aquáticas são limitadas ainda, quando comparadas às informações existentes para ruminantes (ZHANG et al., 2016).

Conhecida popularmente como erva-cidreira ou falsa-melissa, sendo originária da América do Sul, a *Lippia alba* é um arbusto aromático (MARTINS et al., 2000; SILVA JUNIOR, 1998) e possui ampla variabilidade química de compostos, sendo que seus óleos essenciais possuem várias utilizações na medicina popular e na fitoterapia. O componente linalol (3,7-dimetil-octa-1,6-dien-3-ol), presente no óleo essencial, desperta interesse pelo seu rendimento a partir da planta, sendo empregado nas indústrias de aromatizantes, cosméticos e perfumes (JANNUZZI et al., 2010). A *L. alba* foi testada para jundiá (*Rhamdia quelen*), para o qual se mostrou seguro e eficaz, além disso, amenizando o estresse oxidativo em experimentos de transporte simulado (CUNHA et al., 2010; AZAMBUJA et al., 2011).

A espécie *Aloysia triphylla* é conhecida como cidrô, cidrão ou limonete, também é nativa da América do Sul, tem porte arbustivo, ramificado e ereto, podendo chegar até 3 metros de altura (LORENZI e MATOS, 2008). O chá das folhas apresenta propriedades antipirética, analgésica e anti-inflamatória, além de sedativas, antioxidantes e digestivas (EL-HAWARY et al., 2012). A planta *A. triphylla*, foi testada no camarão *Litopenaeus vannamei*, onde se obteve um efeito eficaz na indução anestésica em níveis mais altos. Já em concentrações mais baixas, apresentou efeito para obtenção de sedação mais superficial em experimentos de transporte simulado (PARODI et al., 2012).

A utilização de compostos provenientes de plantas, os quais tem potencial antioxidante, tem contribuído tanto para uma melhora no desempenho zootécnico quanto nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos de diversos organismos aquáticos. Além disso, óleos essenciais e extratos naturais podem ser consideradas boas alternativas aos antibióticos e compostos sintéticos, pois são mais seguros aos manipuladores, aos animais e ao meio ambiente. Desta forma, os experimentos realizados durante a presente tese tiveram como objetivo compreender se a adição dos óleos essenciais de *Lippia alba* e *Aloysia triphylla* à dieta pode não resultar em efeitos deletérios ou, até em mesmo, melhorar os parâmetros zootécnicos, fisiológicos e bioquímicos de juvenis de *Macrobrachium rosenbergii*. Os resultados reportados neste estudo poderão servir de base para futuras pesquisas que busquem a utilização de suplementos alternativos à dieta e no manejo de camarões de água doce, os quais, conforme a literatura, tem sido considerados também, como imunoestimulantes e promotores de crescimento. Por fim,

torna-se necessário um maior número de pesquisas relacionando-se à utilização de anestésicos em invertebrados, nomeadamente, camarões de água doce, visto que as normas mais atuais de bem-estar animal já incluem estes organismos em suas diretrizes.

2.6 Referências

AGUIAR, J. S.; COSTA, M.C.C.D.; NACIMENTO, S.C.; SENA, K.C.F.R. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 436–440, set. 2008.

AKBARI, S.; KHOSHOD, M.J.; RAJAIN, H.; AFSHARNASAB, M. The use of eugenol as an anesthetic in transportation of with indian shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) post larvae. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 10:423-429. 2010. Doi: 10.4194/trjfas.2010.0317.

AKBARIAN, A.; MICHIELS, J.; DEGROOTE, J.; MAJDEDDIN, M.; GOLIAN, A.; DE SMET, S. Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.7, n.37, p.1-14, 2016.

APEL, K.; HIRT, H. Espécies reativas de oxigênio: metabolismo, estresse oxidativo e transdução de sinal. **Revisão Anual de Biologia Vegetal**, v. 55, p. 373-399. 2004.

AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 67, p. 40-54, 2017.

AZAMBUJA, C. R., MATTIAZZI, J., RIFFEL, A. P. K., FINAMOR, I. A., GARCIA, L. O., HELDWEIN, C. G., HEINZMANN, B. M., BALDISSEROTTO, B., PAVANATO, M. A., LLESUY, S. F. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture** 319, p. 156–161. 2011.

BARBOSA, K. B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, p. 629-643, 2010.

BARRENTO, S., MARQUES, A., VAZ-PIRES, P., NUNES, M. L. Cancer pagurus (Linnaeus, 1758) physiological responses to simulated live transport: influence of temperature, air exposure and AQUI-S®. **Journal of Thermal Biology**, 36(2):128-137. 2011.

BARTON, B.A.; IWANA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 10, p. 3-26, 1991.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes. **Rev. Nutr., Campinas**, 12(2): p.123-130. 1999.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011**. Brasília: República Federativa do Brasil. 2013.

BRAZ-MOTA, S., SADAUSKAS-HENRIQUE, H., DUARTE, R. M., Val, A. L., e ALMEIDA-VAL, V. M. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. **Chemosphere**, 135: 53-60. 2015.

BROWN, P.B.; WHITE, M.R.; CHAILLE, J.; et al: Evaluation of three anesthetic agents for crayfish (*Orconectes virilis*). **J Shellfish Res** 15:433-435, 1996.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul (ARTMED), 1996. 446 p.

COYLE, S.D., DASGUPTA, S., TIDWELL, J.H., BEAVERS, T., BRIGHT, L.A., YASHARIAN, D.K. 2005. Comparative efficacy of anesthetics for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 36:282–290. 2005.

CUNHA, M. A., BARROS, F. M. C., GARCIA, L. O., VEECK, A. P. L., HEINZMANN, B. M., LORO, V. L., EMANUELLI, T., BALDISSEROTTO, B., Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture** 306, p. 403–406. 2010.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4– 29, 2016. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.021.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007. doi: 10.1002/ptr.2072.

EL-HAWARY, S.S.; YOUSIF, M.F.; MOTAAL, A.A.A.; ABD-HAMEED, L.M. Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, Cairo University, p. 1110-1116, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2011.12.001>.

FERRARO, E.A; PRESSACCO, L. Anesthetic procedures for crustaceans. An assessment of isobutanol and xylazine as general anaesthetics for *Squilla mantis* (Stomopoda). **Mem Biol Mar Oceanogr** 12:471-475, 1996.

FERREIRA, N.C., BONETTI, C., SEIFFERT, W.Q. Hydrological and water quality indices as management tools in marine shrimp culture. **Aquaculture**, 318:425-433. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Year book of fisher statistics: summary tables. Rome. 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2018 - **Meeting the sustainable development goals**. Rome: 2018.

GARDNER C: Options for humanely immobilizing and killing crabs. **J Shellfish Res** 16:219-224, 1997.

GERWICK, L.; DEMERS, N.E.; BAYNE, C.J. Modulation of stress hormones in rainbow trout by means of anesthesia, sensory deprivation and receptor blockade. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 329-334, 1999.

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, 36(1): p. 64-77, 2011.

GRÖNER, F.; ZIKOVÁ; A.; KLOAS, W. Effects of the pharmaceuticals diclofenac and metoprolol on gene expression levels of enzymes of biotransformation, excretion pathways and estrogenicity in primary hepatocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 167, p. 51–57, 2015.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**. Oxford, Inglaterra, GB, v. 59, p. 1609–1623, 1992.

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

HWANG, J.; SI-WOO LEE, S.; RHA, S.; YOON, S.; PARK, E.; HAN, K.; KIM, S. Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Aquaculture International**. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da pecuária municipal 2017**. Rio de Janeiro, v.45, 2018. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2019.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J.K.A.; VIEIRA, R.F.; SILVA, D.B.; BIZZO, H.R.; GRACINDO, L.A.M. Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Hortic. Bras. Brasília.**, 28(4): p. 412-417, 2010.

KANANI, H.G.; NOBAHAR, Z.; KAKOOLAKI, S.; JAFARIAN, H. Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. **Fish Physiol. Biochem.**, 40: 481-490, 2014.

LEWBART, G.A.; MOSLEY, C. Clinical Anesthesia and Analgesia in invertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine** 21, pp 59–70.2012.

LI, C.; ZHANG, G.; ZHAO, L.; MA, Z.; CHEN, H. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. **World journal of surgical oncology**, 14(1), 15. 2016.

LIVINGSTONE, D.R.; LEMAIRE, P.; MATTHEWS, A.; PETERS, L.; BUCKE, D.; LAW, R.J. Pro-oxidant, antioxidante and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. **Mar. Pollut. Bull.** V. 26, p. 602-606, 1993.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Ed. Nova Odessa: Plantarum. 2008. 554p.

LOVE DC, RODMAN S, NEFF RA, NACHMAN KE. Veterinary drug residues in seafood inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009. **Environ Sci Technol**, 45 (17), 7232–7240. 2011.

MAJOLO, C.; DA ROCHA, S.I.B.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; BIZZO, H.R. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, 48(5): p. 2380-2387. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/are.13073>.

MARAN, E., FERNÁNDEZ, M., BARBIEI, P., FONT, G., RUIZ, M. J. Effects of four carbamate compound on antioxidant parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.72 p.922-930. 2009.

MARICCHIOLO, G., GENOVESE, L. Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. **Open Marine Biology Journal**, 5:24-33. 2011.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV. 2000. 220p.

MATÉS, J.M.; PEREZ-GOMEZ, C.; NUNEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595-603. 1999.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, 27(2): p. 4050-4063, 2009.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010

OLIVEIRA, R. **Antioxidante na viabilidade do sêmen equino congelado e refrigerado**. 2011. 54 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

OLIVEIRA, S.R.N.; OLIVEIRA, M.A.S.; BRANDÃO, F.R.; CHAVES, F.C.M.; CHAGAS, E.C. Toxicity of *Lippia origanoides* essential oil in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its effect against *Aeromonas hydrophila*. **Bol. Inst. Pesca** 44(2).2018.

OSWALD, R.L. Immobilization of decapod crustaceans for experimental purposes. **J Mar Biol Assoc** 57:715-721, 1997.

PAMPLONA, J.H. Avaliação dos efeitos tóxicos de dipirona sódica em peixe *Rhamdia quelen*: Estudo bioquímico, hematológico e histopatológico. 2009. 70 f. **Dissertação** (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PARODI T.V., CUNHA M.A., HELDWEIN C.G., SOUZA D.M., MARTINS A.C., GARCIA L.O.; WASIELESKY, W.J.; MONSERRAT, J.M.; SCHMIDT, D.; CARON, B.O.; HEINZMANN, B.; BALDISSEROTTO, B. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Alloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei*

(Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology e Pharmacology** 2012. 155(3):462-468. Doi:10.1016/j.cbpc.2011.12.003.

PAVADI, P.; HONNANANDA, B.R.; MURTHY, S.H.; CHOUDHARY, B.K. Dietary administration of β -1, 3-Glucan enhances the immune ability of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* and it's resistance against white muscle disease (De man). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n. 3, p. 372-378, 2018.

PINHEIRO, M.A.A.; HEBLING, N.J. **Biologia de Macrobrachium rosenbergii (De Man, 1879)**, p.21-46, in Valenti, W.C. (ed.), Carcinicultura de água doce. Tecnologia para produção de camarões. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília, 1998.

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling, **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1163– 1182, 2004.

POLIMANTI, R.; CARBONI, C.; BAESSO, I.; PIACENTINI, S.; DE STEFANO, G.F.; FUCIARELLI, M. Genetic variability of glutathione S-transferase enzymes in human populations: Functional inter-ethnic differences in detoxification systems. **Gene**, v. 512, p. 102 - 107, 2012.

PUERTO, M., PICHARDO, S., JOS, A., PRIETO, A.I., SEVILLA, E., TRIAS, J.E., CAMEAN, A.M. Differential oxidative stress responses to pure microcystin-LR and microcystin containing and non-containing cyanobacterial crude extracts on Caco-2 cells. **Toxicol National Library of Medicine National Institutes of Health**, 55, p.514–522. 2010. doi: 10.1016/j.toxicol.2009.10.003.

REGOLI, F; PELLEGRINI, D; WINSTON, G.W; GORBI, S; GIULIANI, S; VIRNO-LAMBERTI, C. Aplicação de biomarcadores para avaliar o impacto biológico de materiais dragados no Mediterrâneo: a relação entre respostas antioxidantes e susceptibilidade para o stress oxidativo na tainha vermelha (*Mullus barbatus*). **Pollut Março** Touro, 44, p.912-922. 2002.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21. 2005.

RICO A, SATAPORNVANIT K, HAQUE MM, MIN J, NGUYEN PT, TELFER TC, Van den Brink PJ. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. **Rev Aquacult**, 4, 75–93. 2012.

ROCHA, C. M. C. da; RESENDE, E. K. de; ROUTLEDGE, E. A. B.; LUNDSTED, L. M. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.8, p.4-6. 2013.

ROCHA, I. P. Dimensão da cadeia produtiva da carcinicultura brasileira. **Feed e Food**, n. 62, p. 101- 104, 2012.

ROSS. L.G., ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Blackwel Publishing Ltd. Oxford. UK. 2008.

SACCOL, E. M. H., J. UCZAY, T. S. PÊS, I. A. FINAMOR, G. M. OURIQUE, A. P. K. RIFFEL, D. SCHMIDT, B. O. CARON, B. M. HEINZMANN, S. F. LLESUY, R. LAZZARI, B. BALDISSEROTTO e M. A. PAVANATO. Addition of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, 416-417: p.244-254, 2013.

SAMANTA, P., PAL, S., MUKHERJEE, A.K., GHOSH, A.R., Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 107, p. 120-125. 2014.

SAYDMOHAMMED M, PAL A.K. Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**. 298(1-2): p.162-167. 2009. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.10.020.

SCHMIDT, L.; BIZZI, C.A.; DUARTE F.A.; MULLER, E.I.; KRUPP, E.; FELDMANN, J.; FLORES, E.M.M. Evaluation of Hg species after culinary treatments of fish, **Food Control**, 47, p. 413-419. 2015.

SHAKYA, S.R. Medicinal uses of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) improves growth and enhances immunity in aquaculture. **International Journal of Chemical Studies**, v. 3, n. 2, p. 83-87, 2015.

SIKKA S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SILVA DAMASCENO, E. T. et al. *Lippia origanoides* Kunth. essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and ρ -coumaric acid: Encapsulation efficiency and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 85–94. 2018.

SILVA JUNIOR, A.A. **Plantas medicinais**. Itajaí: EPAGRI, 1998. CD-Rom.

SIQUEIRA-LIMA, P. S.; PASSOS, F.R.S.; LUCCHESI, A.M.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; LIMA, A.A.N.; ZENGIN, G.; QUINTANS, J.S.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Central nervous system and analgesic profiles of *Lippia* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 125–135, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.006>.

SNEDDON, L. U. Clinical anesthesia and analgesia in fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, 21(1), 32-43.2012.

SOUZA, M.D.; BORGES, D.V.; FURTADO, P.; ROMANO, A.L.; WASIELESKY JR, W.; MONSERRAT, J.M.; GARCIA, L.O. Antioxidant enzyme activities and immunological system analysis of *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc technology (BFT) at different water temperatures. **Aquaculture**. v. 451, p. 436-443. 2016.

SOUZA, R.C.; COSTA, M.M.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; SCHMIDT, D.; CARON, B.O.; COPATTI, C.E. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial Pathogenesis**, 113: 29-33. 2017. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.013.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.29, p. 1715-1733, 1996

SOLTANI, M., MARMARI, G.H., MEHRABI, M.R., Acute toxicity and anesthetic effects of clove oil in *Penaeus semisulcatus* under various water quality conditions. **Aquaculture International**, 12:457–466. 2004.

SUTILI, F.J.; GATLIN, D.M.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. Reviews in **Aquaculture**, v.10, n.3, p.716-726, 2017. doi: 10.1111/raq.12197.

TACON, A.G.J. E METIAN, M. Fish matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. **Reviews in Fisheries Science**, 21(1): p. 22-38. 2013.

TAVECHIO, W.L.G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **B Inst Pesca**, 35(2), 335 – 341. 2009.

TEIXEIRA, R.R.; SOUZA, R.C.; SENA, A.C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, M.; COUTO, R.D.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Aloysia triphyla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research**, v. 48, n.7, 2017. <https://doi.org/10.1111/are.13165>.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p. 1366-1375, 2011. doi: 10.1016/j.dci.2011.07.002.

VIEIRA, C.E.D., COSTA, P.G., LUNARDELLI, B., OLIVEIRA, L.F., CABRERA, L.C., RISSO, W.E., PRIMEL, E.G., MELETTI, P.C., FILLMANN, G., MARTINEZ, C.B.R. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Sci. Total Environ**. 542, p. 44-56. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.071>.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p.57-149, 2003.

WALKER, P.J., MOHAN, C. V. Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. **Reviews in Aquaculture**, 1:125-154. 2009.

WANG, W.N.; WANG, A.L.; LIU, Y.; XIU, J.; LIU, Z.B.; SUN, R.Y. Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense*. **Aquaculture**, 256(1-4), 624–630. 2006. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.02.009.

WANG, Z.; YANK, S.; LIU, H.; SUN, P.; LIU, H. Hepatic oxidative stress biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to four benzophenone UV filters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.119, p. 116-122, 2015.

WENDELAAR BONGA, S.E. Hormonal responses to stress: Hormone response to stress In: FARRELL, A.P; CECH, J.J; RICHARDS, J.G; STEVENS, E.D. (Eds). **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment**. Ed: Elsevier, Vancouver, 2011. 2266p.

YARNPAKDEE S.; BENJAKUL S.; PENJAMRAS P. e KRISTINSSON H.G. Chemical compositions and muddy flavour/odour of protein hydrolysate from Nile tilapia and broadhead catfish mince and protein isolate. **Food Chem.**, 1;142:210-6. 2014.

ZAHL, I.H., SAMUELSEN, O., KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology Biochemistry**, 38:201–218. 2012.

ZEPPENFELD, C. C., HERNÁNDEZ, D. R., SANTINÓN, J. J., HEINZMANN, B. M., DA CUNHA, M. A., SCHMIDT, D., e BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, 22, p. 933-940. 2016. <https://doi.org/10.1111/anu.12311>.

ZHANG Y.; WANG, Q.C.; YU, H.; ZHU, J.; DE LANGE, K.; YIN, Y.; WANG, Q.; GONG, J. Evaluation of alginate-whey protein microcapsules for intestinal delivery of lipophilic compounds in pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 96: 2674–2681. 2016.

ZHENG, Z. L., TAN, J. Y. W., LIU, H. Y., ZHOU, X. H., XIANG, X., e WANG, K. Y. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant, effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, 292, p.214-218. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.025>.

3 ÓLEO ESSENCIAL *Lippia alba* NA DIETA DE *Macrobrachium rosenbergii*: EFEITOS SOBRE AS ENZIMAS ANTIOXIDANTES E PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sobrevivência, o desempenho zootécnico e as enzimas antioxidantes em *M. rosenbergii* alimentadas com dietas suplementadas com diferentes doses de óleo essencial de *Lippia alba* (OELA). Os juvenis de *Macrobrachium rosenbergii* ($0,060 \pm 0,004$ g; $2,018 \pm 0,071$ cm) foram alimentados durante 60 dias com dietas contendo diferentes doses de OELA: (0,0 - controle, 1,0 ou 2,0 mL de OELA / kg; em triplicata, com 20 camarões / réplica). Após o período experimental, foram verificados os efeitos do OELA sobre a sobrevivência, ganho de peso, comprimento, fator de condição e taxa de conversão alimentar, a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona-S-transferase (GST), a atividade da enzima antioxidante não enzimática glutaciona reduzida (GSH), a peroxidação lipídica e as atividades Na^+/K^+ -ATPase no hepatopâncreas e brânquias, respectivamente. Não houve diferenças significativas na sobrevivência, parâmetros de crescimento e atividade branquial de Na/K -ATPase. No entanto, as atividades da glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona-S-transferase (GST) foram menores nos hepatopâncreas de camarões alimentados com 1,0 mL de dieta OELA / kg em comparação ao controle. Além disso, a atividade da enzima superóxido dismutase foi maior nos hepatopâncreas de camarões que receberam 2,0 mL de dieta OELA / kg em comparação com aqueles alimentados com 1,0 mL de OELA / kg dieta. Embora a adição de ambas as doses de OELA não tenha melhorado os parâmetros de sobrevivência e crescimento de *M. rosenbergii*, essas doses contribuíram para diminuir a peroxidação lipídica. Além disso, a dose de 2,0 mL de dieta OELA / kg contribuiu para aumentar as atividades de enzimas antioxidantes no hepatopâncreas, melhorando o status antioxidante a fim de evitar a perda de funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos e, portanto, a dose de 2,0 mL de OELA pode ser recomendada como suplementação dietética para *M. rosenbergii*.

Palavras-chave: aditivos alimentares; camarão de água doce; análise bioquímica.

* Artigo publicado

Cagol, L.; Baldisserotto, B.; Becker, A.G.; Souza, C.F.; Heinzmann, B.M.; Caron, B. O.; Leone, F.A.; Santos, L.D.; Ballester, E.L.C. Essential oil of *Lippia alba* in the diet of *Macrobrachium rosenbergii*: effects on antioxidant enzymes and growth parameters. Aquaculture Research. 2020. doi: 10.1111/are.14569.

ESSENTIAL OIL OF *Lippia alba* IN THE DIET OF *Macrobrachium rosenbergii*: EFFECTS ON ANTIOXIDANT ENZYMES AND GROWTH PARAMETERS

ABSTRACT

The aim of the current study was to evaluate the survival, the zootechnical performance and antioxidant enzymes in *M. rosenbergii* fed diets supplemented with different doses of *Lippia alba* essential oil (OELA). *Macrobrachium rosenbergii* juveniles (0.060 ± 0.004 g; 2.018 ± 0.071 cm) were fed for 60 days with diets containing different doses of OELA: (0.0 - control, 1.0 or 2.0 mL of OELA/kg; in triplicate, with 20 prawns/replica). After the experimental period, the effects of OELA on survival, weight gain, length, condition factor and feed conversion rate, the activity of the antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione-S-transferase (GST), besides the activity of the non-enzymatic antioxidant enzyme: reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation and Na^+ / K^+ -ATPase activities in the hepatopancreas and gills, respectively, were evaluated. There were no significant differences in survival, growth parameters and Na/K -ATPase gills activity. However, the activities of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST) were lower in the hepatopancreas of shrimp fed 1.0 mL of OELA / kg diet compared to the control. Moreover, the activity of the superoxide dismutase enzyme was higher in the prawn hepatopancreas that received 2.0 mL of OELA/kg diet compared to those fed 1.0 mL. Although the addition of both doses of OELA did not improve the parameters of survival and growth of *M. rosenbergii*, these doses contributed to decrease lipid peroxidation. Furthermore, the 2.0 mL dose of OELA/kg diet contributed to increase the activities of antioxidant enzymes in the hepatopancreas, improving the antioxidant status in order to avoid the loss of biological functions and/or homeostatic imbalance, the manifestation of which is the damage potential oxidative effect against cells and tissues and, therefore, the 2.0 mL dose of OELA can be recommended as a dietary supplement for *M. rosenbergii*.

Keywords: growth metrics; feed additives; antioxidant enzymes; freshwater prawn; biochemical analysis.

3.1 Introdução

A produção de crustáceos tem mostrado um aumento constante nos últimos anos (de 2010 a 2016) atingindo 7.862 milhões de toneladas no ano de 2016 (FAO, 2018), sendo o camarão gigante, *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879), responsável por 3% desse total (cerca de 234.000 toneladas). Assim, *M. rosenbergii* é considerado uma fonte de alimento humano comercialmente importante e, além disso, vários estudos mostraram que esta espécie pode ser adaptada às condições de cultivo ou laboratório (BALLESTER et al., 2017, BALLESTER, MAURENTE, HELDT, e DUTRA, 2018; COHEN, RA'ANAN, e BRODY, 1981. COHEN, RA'ANAN, RAPPAPORT, e ARIELI, 1983; NEGRINI et al., 2017; VALENTI, DE MELLO, e CASTAGNOLLI, 1993). Portanto, esta espécie é um modelo biológico adequado para investigação e desenvolvimento de novas metodologias que reduzam o estresse devido aos procedimentos de aquicultura, como biometria, transporte e manejo.

Nos últimos anos, vários estudos sobre o uso de aditivos biológicos, como os óleos essenciais (OEs) obtidos de plantas, na dieta de organismos aquáticos, têm sido relatados (ASADI et al., 2018; SACCOL et al., 2013 SOUZA et al., 2015; ZEPPENFELD et al., 2016). Essa abordagem está relacionada ao aumento da população humana e à necessidade de uma produção maior e natural de aquicultura no menor tempo possível, sem causar efeitos adversos nos organismos aquáticos (ASADI et al., 2018). Compostos fenólicos e terpenoides de aditivos vegetais possuem atividade antioxidante, atuando como sequestrantes de radicais, modificando a flora intestinal, aumentando a digestibilidade e a absorção de nutrientes e, conseqüentemente, melhorando o desempenho de crescimento e resposta imune (GIANNENAS et al., 2012; HARIKRISHNAN, BALASUNDARAM, e HEO, 2011; NICIFOROVIC et al., 2010; TAYAG et al., 2010). No entanto, a adição de novos componentes dietéticos pode resultar em algum estresse, como desequilíbrio nutricional, que afeta a saúde e o desempenho animal e leva ao estresse oxidativo.

Esse estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o sistema antioxidante, essencial para manter a homeostase do organismo (BETTERIDGE, 2000). O sistema de defesa antioxidante inclui as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione-S-transferase (GST), e também antioxidantes não enzimáticos, como glutathione reduzida (GSH), carotenóides, ácido ascórbico, retinol e α -tocoferol (AZAMBUJA et al., 2011; LUSHCHAK, 2011; YANG et al., 2011). Situações estressantes podem interferir no metabolismo intermediário dos crustáceos, através de ações específicas sobre importantes enzimas relacionadas aos processos de degradação de carboidratos, lipídios e aminoácidos

(JIANG et al., 2009) ou até mesmo de proteínas osmorreguladoras (JAHN, CAVAGNI, KAISER e KUCHARSKI, 2006). Além disso, os compostos antioxidantes são sintetizados pelas plantas como produtos secundários atuando como mecanismos de defesa contra a produção de ROS e evitando o dano oxidativo (NICIFOROVIC et al., 2010). Vários estudos têm relatado o uso de ervas medicinais para melhorar o crescimento, status antioxidante, resposta imune e sobrevivência em espécies de crustáceos (ASADI et al., 2018; IMMANUEL et al., 2004; LIU et al., 2010; VASEEHARAN et al., 2011; WANG et al. 2017; YUDIATI et al., 2016). No entanto, as respostas à adição de óleo essencial de *Lippia alba* (OELA) na dieta de *M. rosenbergii* não foram investigadas até o momento.

Lippia alba (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) é um arbusto aromático distribuído mundialmente (HENNEBELLE et al., 2008). Para alguns organismos aquáticos o OELA tem demonstrado efeito anestésico, melhora na qualidade da água, além de melhora dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e das respostas antioxidantes (AZAMBUJA et al., 2011; BECKER et al., 2012, 2016; CUNHA et al., 2010, 2011; HOHLENWERGER et al., 2016, 2017; PARODI et al., 2012; SALBEGO et al., 2017; SIMÕES et al., 2017; SOUZA et al., 2018a; TONI et al., 2014). Efeitos positivos da adição dietética de OELA foram encontrados no jundiá, *Rhamdia quelen*, no qual houve uma diminuição da peroxidação lipídica e um aumento nas reservas de lactato e glicogênio, além de melhorar a resposta antioxidante tecidual (SACCOL et al., 2013), e uma melhora na conversão alimentar e atividade imunológica na tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SOUZA et al., 2018b). Dessa forma, a análise do estresse oxidativo parece relevante para a compreensão da fisiologia e do desempenho de crescimento do camarão alimentado com suplementação dietética de OELA.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência, o desempenho de crescimento e as enzimas antioxidantes em *M. rosenbergii* alimentadas com dietas suplementadas com diferentes doses de OELA. Além disso, esta é a primeira descrição dos efeitos da adição dietética de um OE na atividade da Na^+/K^+ - ATPase em crustáceos.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Material

Todas as soluções foram preparadas utilizando água Millipore Milli-Q ultrapura, apirogênica e todos os reagentes utilizados eram da mais alta pureza comercialmente disponível. Tris, ATP ditris sal, piruvato quinase (PK), fosfoenolpiruvato (PEP), NADH, ácido N- (2-hidroxietil) piperazina-N'-etanossulfônico (HEPES), lactato desidrogenase (LDH),

agarose, borato de sódio, alamicina, EDTA e ouabaína, foram adquiridos à Sigma-Aldrich Chemical Co. (EUA).

3.2.2 Material vegetal e extração de óleo essencial

O óleo essencial de *Lippia alba* (OELA) foi obtido por destilação a vapor de folhas frescas por 3h em aparelho de Clevenger (EUROPEAN PHARMACOPUEIA, 2007) e armazenado a - 4°C até sua utilização. O OE foi analisado em um GC Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massas 5975C com uma coluna capilar de sílica fundida não polar HP5-MS (5% fenil - 95% methylsiloxane, 30 mx 0,25 mm id x 0,25 mm espessura da película) e EI-MS de 70 eV. Parâmetros de análise - gás carreador: He (1 mL min⁻¹); entrada dividida: 1: 100; temperatura do injetor e do detector: 250°C; Programa de temperatura: 40°C por 4 min e 40°C - 320°C a 4°C min⁻¹. Os componentes da OE foram identificados por meio da comparação dos espectros de massa e índice de retenção de Kovats com os dados da literatura (NIST, 2010). A análise quantitativa foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent 7890A equipado com um detector de ionização de chama, usando uma coluna com os mesmos recursos e programa descritos acima, exceto a injeção no modo sem divisor e as temperaturas do injetor e detector a 300 °C. A amostra de OE foi injetada em triplicata e a porcentagem relativa dos componentes foi estimada pela integração da área do pico obtida a partir dos cromatogramas FID (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial *Lippia alba*.

IR* experimental	IR* literatura ^a	Composto químico	Composto percentual
971	973	Sabinene	0,68
992	985	β-Pinene	6,07
1003	1010	Limonene	1,57
1029	1031	1,8-Cineole	6,58
1048	1050	β-E-ocimene	3,67
1111	1100	Linalool	59,93
1129	1130	1,3,8-p-Menthatriene	3,47
1200	1200	Carveol	1,07
1205	1202	Myrtenol	0,77
1267	1269	α-Citral	1,81
1415	1415	β-Caryophyllene	3,45
1476	1481	β-Cubebene	1,30
1552	1550	Selina-3,7(11)-diene	0,30
Compostos identificados			90,74

*IR=Índice de retenção; ^aNIST, 2010.

3.2.3 Camarões, desenho experimental e fabricação de dieta experimental

Juvenis de *Macrobrachium rosenbergii* (n = 180) foram obtidos do Laboratório Comercial LACQUA localizado em Palotina, PR, Brasil e transportados para o Laboratório de Carcinicultura da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, no qual foram mantidos durante o período de aclimação (15 dias) em tanques circulares (200L, densidade de 50 camarões / m²), com filtração mecânica e biológica.

O delineamento experimental foi constituído por nove tanques (300 L, com densidade de 40 camarões / m², equivalentes a 20 camarões / tanque), com sistema de recirculação de água, aeração adequada e controle de temperatura sob fotoperíodo natural de 12 horas de luz diurna. Os camarões utilizados nos experimentos apresentaram peso inicial e comprimento de $0,060 \pm 0,004$ g e $2,018 \pm 0,071$ cm, respectivamente (média \pm EPM). Além disso, os parâmetros de qualidade da água foram monitorados e controlados conforme relatado por Ballester et al. (2018), e os valores foram os seguintes (média \pm DP): temperatura ($27,28 \pm 2,17$ ° C), pH ($8,18 \pm 0,46$), oxigênio dissolvido ($7,97 \pm 0,92$ mg / L), nitrogênio amoniacal total ($0,001 \pm 0,0002$ mg N / L), nitrito ($0,004 \pm 0,0007$ mg / L), nitrato ($3,46 \pm 1,15$ mg / L), alcalinidade ($95,0 \pm 9,0$ mg CaCO₃ / L) e dureza ($53,0 \pm 10,0$ mg CaCO₃ / L).

Os nove tanques foram, então, divididos em três grupos experimentais com as seguintes dietas: 0,0 (controle), 1,0 ou 2,0 mL de OELA por kg de dieta (36% de proteína bruta (MITRA, CHATTOPADHYAY E MUKHOPADHYAY, 2005; REED e D ABRAMO, 1989) (Tabela 2). Para a preparação de dietas experimentais, todos os ingredientes sólidos foram moídos (0,5 mm) em um moinho de martelos e, posteriormente, todos os ingredientes foram misturados de acordo com a formulação (Tabela 2) para processamento. Os péletes foram fabricados em uma peletizadora experimental pré-umedecendo a mistura com água à uma temperatura de 35° C. Após a peletização, os péletes (1 mm) foram secos em estufa de ar forçado por 24 horas a 45°C e armazenadas refrigeradas para uso posterior. Os camarões foram alimentados, durante 60 dias, três vezes ao dia (8:30 h, 13:30 h, e 18:30 h) com taxa de alimentação inicial equivalente a 15% da biomassa. A quantidade de ração foi ajustada a cada duas semanas com base no peso e no número de camarões em cada tanque, mas mantendo a porcentagem relatada acima. Os tanques foram sifonados para remover os alimentos e fezes não consumidos 30 minutos antes da alimentação.

Tabela 2. Ingredientes e composição das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dieta		
	Controle	OELA 1,0	OELA 2,0
Milho moído	41,98	41,98	41,98

Farinha de peixe	25,00	25,00	25,00
Farelo de soja	25,00	25,00	25,00
Óleo de soja	5,00	4,90	4,80
Amido	2,00	2,00	2,00
Suplemento vitamínico e mineral*	1,00	1,00	1,00
Hidroxitolueno butilato (BHT)	0,02	0,02	0,02
OELA**	0,00	0,10	0,20
Total	100,0	100,0	100,0
Composição centesimal			
Energia (kJ/Kg)	18,57	18,54	18,60
Extrato Etéreo (%)	10,49	10,67	10,79
Umidade (%)	8,72	8,16	8,43
Matéria seca (%)	91,28	91,84	91,57
Proteína bruta (%)	36,00	36,00	36,00
Cinza (%)	11,11	10,92	11,07
Fibra Bruta (%)	6,28	6,25	7,97
ENN*** (%)	27,40	28,00	25,74

* Suplemento vitamínico e mineral - vitamina (níveis de garantia por kg): 16875 UI de vitamina A, 3375 UI de vitamina D3, 200 UI de vitamina E, 6,7 mg de vitamina K3, 120 mg de vitamina B, 36 mg de vitamina B2, 25,5 mg de vitamina B6, 45 mcg vitamina B12, 1200 mg de vitamina C, 11,2 mg de ácido fólico, 67,5 mg de ácido pantotênico, 170 mg de ácido nicotínico, 1,68 mg de biotina, 265 mg de inositol e mineral (níveis de garantia por kg): 65 mg de ferro, 13,8 mg de cobre, 150 mg de zinco, 85 mg de manganês, 0,35 mg de cobalto, 1,3 mg de iodo e 0,4 mg de selênio. **OELA (óleo essencial de *Lippia alba*: a porcentagem corresponde a 0,00, 1,00 e 2,00 mL / kg de OELA). *** Extrativo não nitrogenado.

3.2.4 Parâmetros de desempenho

Após o período experimental, os parâmetros de sobrevivência e crescimento dos animais foram avaliados. Os camarões foram medidos com paquímetro digital 402 (King Tools®) e pesados (Analytical Scale AY 220; Marte®) nos dias 0 e 60 do experimento para avaliação do peso final, ganho de peso (GP), taxa de conversão alimentar (TCA), taxa de crescimento específica (TCE) e comprimento total (medido pela distância linear entre a extremidade do rosto até a ponta do telson) e padrão (distância linear da margem posterior da órbita ocular até a base do telson), respectivamente. Esses parâmetros foram calculados da seguinte forma:

- Sobrevivência (%) = (número final de camarões / número inicial de camarões) x 100;
- Ganho de peso (%) = ((peso final - peso inicial) / peso inicial) x 100;
- Taxa de crescimento específica (TCE% por dia) = [(peso final - peso inicial) / dias do experimento] x 100;
- Fator de condição corporal = [peso total(g) / [comprimento padrão (cm) ^ 3]] x 100;
- Taxa de conversão alimentar (TCA) = (alimento consumido, g) / (ganho de peso, g).

3.2.5 Coleta de amostras para análise bioquímica

Após 60 dias experimentais, os camarões juvenis (n = 15 por grupo experimental) foram cobertos com gelo moído por cerca de 1 min, até que estivessem totalmente imóveis. O hepatopâncreas e as brânquias foram retirados e imediatamente armazenados a -80°C para determinação das atividades das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica e Na⁺/K⁺ - ATPase, respectivamente, seguindo os protocolos descritos por Souza et al. (2018a) e Lucena, McNamara e Leone (2017).

O ensaio da atividade total da SOD (expressa como unidades SOD por mg de proteína) foi baseado na oxidação do pirogalo, um processo altamente dependente do superóxido (MARKLUND, 1985). A atividade da GPx foi estimada através da oxidação do NADPH a 340 nm (WENDEL, 1981), e os resultados foram expressos em unidades por miligrama de proteína. A atividade da GST (expressa em unidades por mg de proteína) foi determinada de acordo com Mannervik e Guthenberg (1981) com ligeiras modificações, estimando-se a taxa de formação de dinitrofenil-S-glutationa a 340 nm. Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram estimados de acordo com o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE e AUST, 1978) e os resultados foram expressos em nmol MDA / mg de proteína.

A atividade total (Na⁺, K⁺) - ATPase foi realizada a 25°C num sistema de acoplamento PK / LDH no qual a hidrólise de ATP foi acoplada à oxidação de NADH de acordo com Leone et al. (2012). Neste sistema, o fosfato liberado durante a hidrólise do ATP pela (Na⁺/K⁺) - ATPase é convertido em ATP, enquanto o fosfoenolpiruvato é convertido em piruvato pela piruvato quinase. O piruvato é convertido em lactato concomitante com a oxidação de NADH. A taxa de hidrólise do ATP pela (Na⁺/K⁺) - ATPase foi estimada pelo monitoramento dos títulos de NADH, e a oxidação do NADH foi monitorada a 340 nm (~ 340 nm, pH 7,5 = 6.200 mol / L / cm) em um UV Shimadzu 1800, espectrofotômetro equipado com suportes de células com termostato.

3.2.6 Declaração de ética

Estudos com invertebrados não requerem autorização do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal tanto da Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE) quanto da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.2.7 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). O teste de Levene foi usado para avaliar a homogeneidade das variâncias dos dados. Todos os dados mostraram variâncias homogêneas e foram comparados usando uma análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software Statistica Software 7.0 (Stat Soft, Tulsa, OK, EUA) e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3.3 Resultados

3.3.1 Desempenho zootécnico

A sobrevivência dos camarões não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos e variou entre 76% e 83% (Tabela 3). Além disso, não houve diferenças significativas no ganho de peso e taxa de crescimento específico e outros parâmetros zootécnicos ($P > 0,05$) dos camarões alimentados com dietas contendo OELA em relação ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3. Desempenho de crescimento e sobrevivência do camarão *Macrobrachium rosenbergii* alimentado com dietas contendo diferentes doses de óleo essencial de *Lippia alba*

	Dieta (mL OELA por kg de dieta)		
	0,0	1,0	2,0
Peso final (g)	0,29 \pm 0,02	0,30 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02
Comprimento final total (cm)	3,25 \pm 0,11	3,21 \pm 0,08	3,22 \pm 0,14
Comprimento final padrão (cm)	2,77 \pm 0,09	2,79 \pm 0,07	2,73 \pm 0,12
Sobrevivência (%)	83,33 \pm 8,33	76,67 \pm 1,67	81,67 \pm 11,67
Ganho de peso (%)	333,33 \pm 20,76	319,05 \pm 20,77	318,05 \pm 31,22
TCE (% por dia)	2,44 \pm 0,08	2,38 \pm 0,08	2,37 \pm 0,13
Fator de condição (g/cm ³)	1,39 \pm 0,08	1,40 \pm 0,07	1,41 \pm 0,09
TCA (g/g)	3,75 \pm 0,22	4,23 \pm 0,35	4,34 \pm 1,16

Os valores são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 3$, $P < 0,05$). TCE = taxa de crescimento específica, TCA = taxa de conversão alimentar. Os comprimentos totais e pesos iniciais foram os seguintes, respectivamente: 2,018 \pm 0,071 cm e 0,060 \pm 0,004 g.

3.3.2 Análises bioquímicas

A atividade da SOD no hepatopâncreas foi 39% maior ($P < 0,05$) em camarões alimentados com 2,0 mL de OELA por kg de dieta do que aqueles alimentados com 1,0 mL de OELA por kg de dieta (Figura 1A). Atividades de GPx e GST foram menores (cerca de 20% e 42,5%, respectivamente; $P < 0,05$) no hepatopâncreas de *M. rosenbergii* alimentados com 1,0 mL OELA por kg de dieta comparado ao controle e 2,0 mL OELA por kg de grupos dietéticos (Figuras 1B e 1C). Os níveis de TBARS foram menores ($P < 0,05$) no hepatopâncreas de camarão alimentado com 1,0 (55%) e 2,0 (50%) mL OELA por kg de dieta, comparado com o

grupo controle (Figura 1D). As dietas contendo OELA não apresentaram efeito significativo ($P > 0,05$) na atividade branquial da $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ (Figura 2).

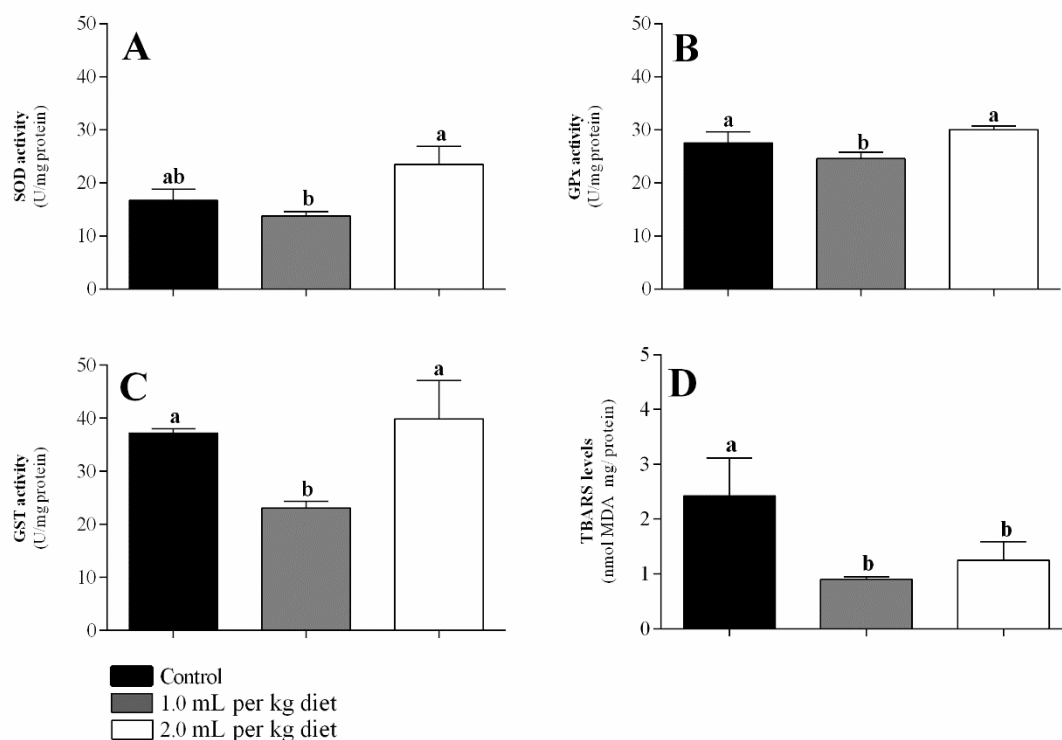


Figura 1. Superóxido dismutase (SOD) (A), glutatona peroxidase (GPx) (B), atividade de glutatona-s-transferase (GST) (C) e níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (D) no hepatopâncreas de *Macrobrachium rosenbergii* alimentados com dietas suplementadas com óleo essencial de *Lippia alba*. Os valores são expressos como a média \pm DP ($n = 3$). Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as dietas ($P < 0,05$).

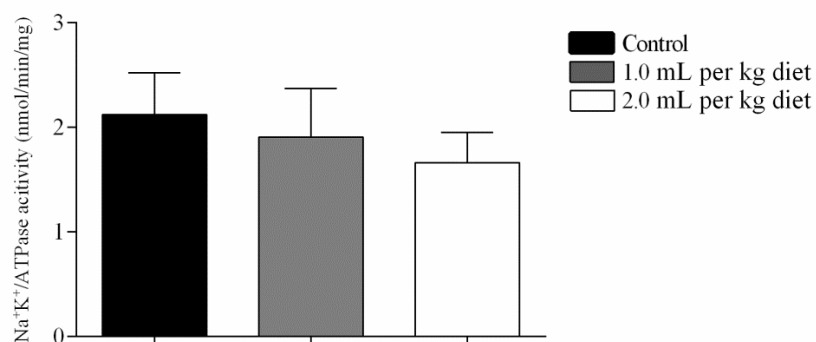


Figura 2. Atividade total (Na^+/K^+) - ATPase em brânquias de *Macrobrachium rosenbergii* alimentadas com dietas suplementadas com óleo essencial de *Lippia alba*. Os valores são expressos como a média \pm DP ($n = 3$, $P < 0,05$).

3.4 Discussão

Os efeitos da suplementação dietética com componentes herbáceos (flores, folhas, sementes e raízes) ou OEs (obtidos de folhas) para peixes, camarões de água salgada e camarões de água doce sobre o desempenho de crescimento, status antioxidante, resposta imune e sobrevivência têm sido relatados (ASADI et al. al., 2018; FRANCIS, MAKKAR E BECKER, 2002; IMMANUEL et al., 2004; JI et al., 2007; LIU et al., 2010; SACCOL et al., 2013; VASEEHARAN et al., 2011; et al., 2017; YUDIATI et al., 2016; ZEPPENFELD et al., 2016; ZHENG et al., 2009). Embora alguns extratos vegetais ou OEs tenham aumentado o desempenho do crescimento, principalmente devido aos efeitos positivos na digestão, absorção e assimilação dos diversos nutrientes (WANG et al., 2017), o presente estudo mostrou que a adição dietética de OELA não interferiu significativamente nestes parâmetros de desempenho e sobrevivência. A suplementação dietética com OELA (0,25 - 2,0 mL por kg de dieta) também não afetou o crescimento e a sobrevivência do jundiá (*Rhamdia quelen*) (SACCOL et al., 2013). No entanto, a adição de 2,0 mL de OELA por kg de dieta melhorou a taxa de conversão alimentar e o fator de condição corporal da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (SOUZA et al., 2018b). Finalmente, os resultados encontrados em nosso estudo podem estar relacionados a uma menor suplementação dietética de OELA, principalmente, quando comparado ao estudo realizado por Talpur e Ikhwanuddin (2012) com robalo asiático (*Lates calcarifer*) que foram alimentados com maiores concentrações de alho (5 - 20 g por kg de ração) apresentando uma melhora significativa do crescimento, ganho de peso e conversão alimentar, ou, ainda, atribuído às espécies animais ou condições de cultivo / laboratório (WANG et al., 2017).

O sistema de defesa antioxidante é um mecanismo bioquímico altamente conservado em invertebrados e vertebrados (CHAINY, PAITAL E DANDAPAT, 2016). Sua principal função é proteger os organismos dos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (ERO), que, em geral, podem oxidar biomoléculas (lipídios, carboidratos, proteínas e DNA) prejudicando as funções celulares normais. Assim, a interrupção no equilíbrio entre os sistemas de oxidação e antioxidantes, por excesso na formação de ERO ou depleção de antioxidantes, caracteriza o estresse oxidativo. As concentrações de ERO podem interferir de duas maneiras nos organismos: baixas concentrações de ERO regulam vários processos fisiológicos, enquanto uma concentração mais alta pode ser tóxica, prejudicando as funções celulares (CHAINY et al., 2016; HAN et al., 2018).

Os parâmetros pró/antioxidantes analisados no hepatopâncreas de *M. rosenbergii* (presente estudo) indicaram resultados interessantes e promissores e, em geral, o efeito antioxidante da OELA corrobora os resultados obtidos em outras espécies. Além disso, é

importante considerar que, nos crustáceos, o hepatopâncreas é o principal centro metabólico para a produção de ERO (BIANCHINI e MONSERRAT, 2007), e a maioria dos óleos essenciais possui potencial antioxidante devido, principalmente, à presença de catadores (varredores) radicais, fenólicos e compostos não fenólicos (FRANZ et al., 2010). Conforme relatado no estudo de Saccol et al. (2013), os OELA têm constituintes de origem terpênica, sendo o linalol o principal componente como o OELA utilizado na pesquisa.

No presente estudo, os camarões alimentados com as duas dietas suplementadas com OELA apresentaram menor lipoperoxidação (LPO) (indicado por níveis mais baixos de TBARS) nos hepatopâncreas em comparação ao controle. Entretanto, camarões alimentados com 2,0 mL de OELA por kg de dieta apresentaram maiores atividades das enzimas antioxidantes SOD, GPx e GST comparativamente aos alimentados com 1,0 mL de EOLA por kg de dieta. O SOD é responsável pela remoção do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) aumentando a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é, então, capturado pelas enzimas catalase e / ou GPx (LUSHCHAK e BAGNYUKOVA, 2006). Na sequência, o GPx catalisa a conversão de H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos em produtos menos reativos, mantendo o equilíbrio dos radicais livres e reduzindo os danos oxidativos. Assim, os resultados encontrados em nosso estudo indicam que a capacidade do sistema antioxidante do hepatopâncreas foi eficiente na redução do dano oxidativo: baixa LPO concomitantemente com altos níveis de SOD, GPx e GST.

Além disso, a GST também atua contra a LPO conjugando xenobióticos e ERO a GSH e favorecendo a desintoxicação (YANG et al., 2001). Curiosamente, a exposição do camarão branco *Litopenaeus vannamei* a 20-40 μ L/L linalol (o principal composto do quimiotipo OELA usado no presente estudo) por 8 h aumentou as atividades de LPO, CAT e GST nas brânquias e hepatopâncreas (BECKER et al., 2015). A adição dietética de OELA (0,5-2,0 mL por kg de dieta) também reduziu os níveis de LPO em alguns tecidos de catfish, mas aumentou a atividade de enzimas antioxidantes (SACCOL et al., 2013), possivelmente devido às suas propriedades sedativas (CUNHA et al., 2010), o que poderia causar uma redução no metabolismo e no consumo de oxigênio. Consequentemente, a redução de ERO justifica os níveis mais baixos de LPO encontrados no hepatopâncreas de *M. rosenbergii* alimentados com dietas contendo OELA.

A $Na^+/K^+ - ATPase$ é uma enzima chave envolvida em muitas atividades fisiológicas, estando presente nos ionócitos de brânquias de organismos aquáticos (MCCORMICK, 1993; STERN, BORUT, e COHEN, 1984). No presente estudo, o OELA dietético não implicou

qualquer efeito sobre a atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial do camarão *M. rosenbergii*, mas jundiás alimentados com 0,25 mL de EOLA por kg de dieta apresentaram um aumento na atividade branquial da Na^+/K^+ -ATPase, indicando que esta suplementação teve efeito sobre a capacidade osmorregulatória (SOUZA et al., 2015), o que não foi observado para os camarões. Espécimes de jundiá anestesiados com OELA (300 ou 450 $\mu\text{L/L}$) apresentaram aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial em relação ao grupo controle (TONI et al., 2014).

3.5 Conclusão

Embora não melhore o desempenho de crescimento e a taxa de sobrevivência, recomenda-se a *M. rosenbergii* a suplementação com 2,0 mL de OELA por kg de dieta, pois diminuiu a LPO e aumentou as enzimas antioxidantes, melhorando o status oxidativo do camarão. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar o mecanismo exato pelo qual o OELA exerce suas propriedades antioxidantes, bem como se a bioatividade observada nos resultados se deve à presença de compostos principais ou é uma consequência de um efeito sinérgico entre as várias moléculas contidas no OELA.

3.6 Referências

ASADI, M. S., GHARAEI, A., HARIJANI, J. M., e ARSHADI, A. A comparison between dietary effects of *Cuminum cyminum* essential oil and *Cuminum cyminum* essential oil, loaded with iron nanoparticles, on growth performance, immunity and antioxidant indicators of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Nutrition**, 24, p. 1466-1473. 2018. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/anu.12683>.

AZAMBUJA, C. R., MATTIAZZI, J., RIFFEL, A. P. K., FINAMOR, I. A., GARCIA, L. O., HELDWEIN, C. G., HEINZMANN, B. M., BALDISSEROTTO, B., PAVANATO, M. A., e LLESUY, S. F. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, 31, p.156-161. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.002>.

BALLESTER, E. L. C., MARZAROTTO, S. A., DE CASTRO, C. S., FROZZA, A., PASTORE, I., e ABREU, P. C. Productive performance of juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc system. **Aquaculture Research**, 48, p. 4748-4755. 2017. <https://doi.org/10.1111/are.13296>.

BALLESTER, E. L. C., MAURENTE, L. P. B., HELDT, A., e DUTRA, F. M. Vitamin and mineral supplementation for *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc system. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 46, p. 855-859. 2018. <http://dx.doi.org/10.3856/vol46-issue4-fulltext-25>.

BECKER, A. G., PARODI, T. V., HELDWEIN, C. G., ZEPPENFELD, C. C., HEINZMANN, B. M., e BALDISSEROTTO, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with

eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 38, p. 789-796. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9562-4>.

BECKER, A. J., JENSEN, L., GARCIA, L. O., SILVA, L. L., MONSERRAT, J. M., WASIELESKY JR., W., HEINZMANN, B. M., e BALDISSEROTTO, B. The efficacy of linalool on transportation and anesthesia of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *In*: Feira Nacional do Camarão, Congresso Latino-Americano e Caribenho de Aquicultura da World Aquaculture Society. Fortaleza, Ceará, Brazil. 2015. <https://www.was.org/meetings/ShowAbstract.aspx?Id=38657>.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism** 49, p. 3-8. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80077-3).

BIANCHINI, A., e MONSERRAT, J. M. Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: protective role of sesamol, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 67, p. 100–108. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.03.006>.

BUEGE, J. A., e AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52, p. 302-310. 1978. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).

CHAINY, G. B. N., PAITAL, B., e DANDAPAT, J. An overview of seasonal changes in oxidative stress and antioxidant defence parameters in some invertebrate and vertebrate species. **Scientifica**, 2016, 6126570. 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6126570>.

COHEN, D., RA'ANAN, Z., e BRODY, T. Population profile development and morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Journal of the World Aquaculture Society**, 12, p. 231-243. 1981. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1981.tb00298.x>.

COHEN, D., RA'ANAN, Z., RAPPAPORT, U., e ARIELI, Y. The production of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) in Israel: Improved conditions for intensive monoculture. **Bamidgeh**, 35, p. 31-37. 1983. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0020894207&origin=inward&txGid=68b822e9a515118525d876ee0a82a3f7>.

CUNHA, M. A., BARROS, F. M. C., GARCIA, L. O., VEECK, A. P. L., HEINZMANN, B. M., LORO, V. L., EMANUELLI, T., e BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 306, 403-406. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014>.

CUNHA, M. A., SILVA, B. F., DELUNARDO, F. A. C., BENOVI, S. C., GOMES, L. C., HEINZMANN, B. M., e BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. **Neotropical Ichthyology**, 9, p. 683-688. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252011000300022>

EUROPEAN PHARMACOPOEIA European Directorate for the Quality of Medicines, 6th ed, Strassbourg.2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture** 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. 2018. <http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>

FRANCIS, G., MAKKAR, H. P. S., e BECKER, K. Dietary supplementation with a *Quillaja saponin* mixture improves growth performance and metabolic efficiency in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, 203, p. 311-320. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00628-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00628-7).

GIANNENAS, I., TRIANTAFILLOU, E., STAVRAKAKIS, S., MARGARONI, M., MAVRIDIS, S., STEINER, T., e KARAGOUNI, E. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, p. 350-353, p. 26-32. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.027>.

HAN, S-Y., WANG, M-Q., WANG, B-J., LIU, M., JIANG, K-Y., e WANG, L. A comparative study on oxidative stress response in the hepatopancreas and midgut of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* under gradual changes to low or high pH environment. **Fish and Shellfish Immunology**, 76, p. 27-34. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.001>.

HARIKRISHNAN, R., BALASUNDARAM, C., e HEO, M.-S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture**, 317, p. 1-15. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>.

HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., JOSEPH, H., e BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology** 116, p. 211-222. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.044>.

HOHLENWERGER, J. C., COPATTI, C. E., SENA, A. C., COUTO, R. D., BALDISSEROTTO, B., HEINZMANN, B. M., CARON, B. O., e SCHMIDT, D. Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, 49, p. 119-126. 2016. <https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1123869>.

HOHLENWERGER, J. C., BALDISSEROTTO, B., COUTO, R. D., HEINZMANN, B. M., SILVA, D. T., CARON, B. O., SCHMIDT, D., e COPATTI, C. E. Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. **Ciência Rural**, 47(03) 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160040>.

IMMANUEL, G., VINCYBAI, V. C., SIVARAM, V., PALAVESAM, A., e MARIAN, M. P. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth, and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. **Aquaculture**, 236, p. 53-65. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.033>.

JAHN, M. P., CAVAGNI, G. M., KAISER, D., e KUCHARSKI, L. C. Osmotic effect of choline and glycine betaine on the gills and hepatopancreas of the *Chasmagnathus granulata* crab submitted to hyperosmotic stress. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 334, p. 1-9. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.01.006>.

JI, S. C., TAKAOKA, O., JEONG, G. S., LEE, S. W., ISHIMARU, K., SEOKA, M., e TAKII, K. Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science**, 73, p. 63-69. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01302.x>.

JIANG, H., LI, F., XIE, Y., HUANG, B., ZHANG, J., ZHANG, J., ZHANG, C., LI, S., e XIANG, J. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress. **Proteomics**, 9, p. 3353-3367. 2009. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800518>.

LEONE, F. A., MASUI, D. C., BEZERRA, T. M. S., GARÇON, D. P., VALENTI, V. C., AUGUSTO, A. S., e MCNAMARA, J. C. Kinetic analysis of gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in selected ontogenetic stages of the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda Palaemonidae): Interactions at ATP- and cation-binding sites. **Journal of Membrane Biology**, 245, p. 201-215. 2012. <https://doi.org/10.1007/s00232-012-9431-9>.

LIU, B., GE, X., HE, Y., XIE, J., XU, P., HE, Y., ZHOU, Q., PAN, L., e CHEN, R. Effects of anthraquinones extracted from *Rheum officinale* Bail on the growth, non-specific immune response of *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, 310, p. 13-19. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.020>.

LUCENA, M. N., MCNAMARA, J. C., e LEONE, F. A. Gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the Amazon River shrimp, *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae): effect of exogenous biogenic amines on enzyme activity in juveniles and adults. **Hydrobiologia**, 789, p. 59-76. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2753-3>.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, 101, p.13-30. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.

LUSHCHAK, V.I., e BAGNYUKOVA, T.V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 144, p. 283-289. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.014>.

MCCORMICK, S. D. Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 50, p. 656-658. 1993. <https://doi.org/10.1139/f93-075>.

MANNERVIK, B., e GUTHENBERG, C. Glutathione transferase (human placenta). *In*: Jakoby, W. B. (Ed.), **Methods in Enzymology**, 77. Academic Press, New York, p. 231–235. 1981. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77030-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77030-7).

MARKLUND, S. L. Direct assay of superoxide dismutase with potassium superoxide. *In*: GREENWALD, R. A. (ed.), **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**. Boca Raton, CRC Press Inc, pp. 249-255.1985.

MITRA, G., CHATTOPADHYAY, D. N., e MUKHOPADHYAY, P. K. Nutrition and feeding in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* farming. **Aqua Feeds Formulation Beyond**, 2, p. 17-19. 2005.

NEGRINI, C., DE CASTRO, C. S., BITTENCOURT-GUIMARÃES, A. T., FROZZA, A., ORTIZ-KRACIZY, R., e BALLESTER, E. L. C. Stocking density for freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae) in biofloc system. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 45, p. 891-899. 2017. <http://dx.doi.org/10.3856/vol45-issue5-fulltext-3>.

NICIFOROVIC, N., MIHAJLOVIC, V., MASKOVIC, P., SOLUJIC, S., STOJKOVIC, A., e PAVLOVIC MURATSPAHIC, D. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, 48, p. 3125-3130.2010. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.007>.

NIST/EPA/NIH, Mass spectral library and search/analysis programs. John Wiley and Sons, Hoboken, EUA. 2010.

PARODI, T. V., CUNHA, M. A., HELDWEIN, C. G., DE SOUZA, D. M., MARTINS, A. C., GARCIA, L. O., WASIELESKY JUNIOR, W., MONSERRAT, J. M., SCHMIDT, D., CARON, B. O., HEINZMANN, B., e BALDISSEROTTO, B. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology**, 155, p. 462-468. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.003>.

REED, L., e D'ABRAMO, L. R. A standard reference diet for crustacean nutrition research. III. Effects on weight gain and amino acid composition of whole body and tail muscle of juvenile prawns *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 20, p. 107-113. 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1989.tb00562.x>.

SACCOL, E. M. H., UCZAY, J., PÊS, T. S., FINAMOR, I. A., OURIQUE, G. M., RIFFEL, A. P. K., SCHMIDT, D., CARON, B.O., HEINZMANN, B. M., LLESUY, S.F., LAZZARI, R., BALDISSEROTTO, B., e PAVANATO M. A. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, 416-417, p. 244-254. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.036>.

SALBEGO, J., TONI, C., BECKER, A. G., ZEPPENFELD, C. C., MENEZES, C. C., LORO, V. L., HEINZMANN, B. M., e BALDISSEROTTO, B. Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. **Brazilian Journal of Biology**, 77, p. 696-702. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.16515>.

SIMÕES, L. N., MEDEIROS, L. C. C., HEINZMANN, B. M., LORO, V. L., GOMES, L. D., DA SILVA, D. T., SCHMIDT, D. e BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba* as a sedative and anesthetic for the sea urchin *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, 50, p. 205-217. 2017. <https://doi.org/10.1080/10236244.2017.1362317>.

SOUZA, C. F., SALBEGO, J., GRESSLER, L. T., GOLOMBIESKI, J. I., FERST, J. G., CUNHA, M. A., HEINZMANN, B. M., CARON, B. O., GLANZNER, W. G., GONÇALVES, P. B. D., e BALDISSEROTTO, B. *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824), submitted to a stressful condition: effect of dietary addition of the essential oil of *Lippia alba* on metabolism, osmoregulation and endocrinology. **Neotropical Ichthyology**, 13, p. 707-714. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20140153>.

SOUZA, C. F., BALDISSERA, M. D., BIANCHINI, E. G., DA SILVA, E. G., MOURÃO, R. H. V., DA SILVA, L. V. F., SCHMIDT, D., HEINZMANN, B. M., e BALDISSEROTTO, B. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia*

quelen). **Fish Physiology and Biochemistry**, 44, p. 21-34. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0410-z>.

SOUZA, R. C., SOUZA, E. M., DA COSTA, M. M., MELO, J. F. B., BALDISSEROTTO, B., e COPATTI, C. E. Dietary addition of the essential oil from *Lippia alba* to Nile tilapia and its effect after inoculation with *Aeromonas* spp. **Aquaculture Nutrition**, 00, p. 1-7. 2018. <https://doi.org/10.1111/anu.12827>.

STERN, S., BORUT, A., e COHEN, D. Characterization of Na-K ATPase from the gills of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry e Molecular Biology**, 79, p. 47-50. 1984. doi: 10.1016/0305-0491(84)90074-9.

TALPUR, A. D., e IKHWANUDDIN, M. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). **Aquaculture**, 364-365, p. 6-12. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.035>.

TAYAG, C. M., LIN, Y. C., LI, C. C., LIOU, C. H., e CHEN, J. C. Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, 28, p. 764-773. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.023>.

TONI, C., BECKER, A. G., SIMÕES, L. N., PINHEIRO, C. G., SILVA, L. L., HEINZMANN, B. M., CARON, B. O., e BALDISSEROTTO, B. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 40, p. 701-714. 2014. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9877-4>.

VALENTI, W. C., DE MELLO, J. T. C., e CASTAGNOLLI, N. Efeito da densidade populacional sobre as curvas de crescimento de *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) em cultivo semi-intensivo (Crustacea, Palaemonidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 10, p. 427-438. 1993. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751993000300009>.

VASEEHARAN, B., SAI PRASAD, G., RAMASAMY, P., e BRENNAN, G. Antibacterial activity of *Allium sativum* against multidrug-resistant *Vibrio harveyi* isolated from black gill-diseased *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture International**, 19, p. 531-539. 2011. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9369-9>.

WANG, Y., LIANG, J.-P., DUAN, Y.-F., NIU, J., WANG, J., HUANG, Z., e LIN, Z.-H. Effects of dietary *Rhodiola rosea* on growth, body composition, antioxidant capacity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal conditions and combined stress of low-salinity and nitrite. **Aquaculture Nutrition**, 23, p. 548-559. 2017. <https://doi.org/10.1111/anu.12422>.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, 77, p. 325-333. 1981. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77046-0).

YANG, Y., CHENG, J. Z., SINGHAL, S. S., SAINI, M., PANDYA, U., AWASTHI, S., e AWASTHI, Y. C. Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced

apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. **Journal of Biological Chemistry**, 276, p.19220-19230. 2001. doi: 10.1074/jbc.M100551200.

YANG, C-Y., LIU, S-J., ZHOU, S-W., WU, H-F., YU, J-B., e XIA, C-H. Allelochemical ethyl 2- methyl acetoacetate (EMA) induces oxidative damage and antioxidant responses in *Phaeodactylum tricornutum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 100, p. 93-103. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.014>.

YUDIATI, E., ISNANSETYO, A., MURWANTOKO, A., TRIYANTO, T., e HANDAYANI, C. R. Innate immune-stimulating and immune genes up-regulating activities of three types of alginate from *Sargassum siliquosum* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, 54, p. 46-53. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.022>.

ZHENG, Z. L., TAN, J. Y. W., LIU, H. Y., ZHOU, X. H., XIANG, X., e WANG, K. Y. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant, effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, 292, p. 214-218. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.025>.

ZEPPENFELD, C. C., HERNÁNDEZ, D. R., SANTINÓN, J. J., HEINZMANN, B. M., DA CUNHA, M. A., SCHMIDT, D., e BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, 22, p. 933-940. 2016. <https://doi.org/10.1111/anu.12311>.

4 ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia triphylla* NA DIETA DE *Macrobrachium rosenbergii*: EFEITOS SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

RESUMO

Nas últimas duas décadas, vários estudos relataram resultados positivos do uso de óleos essenciais de plantas (OE) como aditivo alimentar em várias espécies de animais. Recentemente, essas alternativas nutricionais foram avaliadas e relatadas na produção de peixes e, apesar de ainda escassos na produção de camarões, o uso dos OE tem sido estudado, a fim de aumentar a resistência às doenças e prevenir surtos, bem como melhorar o crescimento e o bem-estar dos animais. Sendo assim, o objetivo deste experimento foi avaliar o uso do óleo essencial de *Aloysia triphylla* (OEAT) na dieta de *Macrobrachium rosenbergii* e seus efeitos sobre o desempenho zootécnico. Juvenis de *M. rosenbergii* ($0,396 \pm 0,185$ g; $3,062 \pm 0,608$ cm) foram alimentados durante 50 dias com dietas contendo diferentes doses de OEAT (0,0 - controle, 1,0, 2,0 e 3,0 mL OEAT / kg de dieta; com cinco repetições). Após o período experimental, foram verificados os efeitos do OEAT sobre a sobrevivência que se manteve acima de 84% para todos os tratamentos. Não foi verificado efeito dos tratamentos para o ganho de peso (294,89, 286,77, 289,19 e 318,64%, respectivamente), taxa de crescimento específico (2,74, 2,75, 2,71 e 2,86% / dia), fator de condição (2,75, 2,93, 3,02 e 2,90 g/cm³) e taxa de conversão alimentar (2,36, 2,44, 2,52 e 2,23 g/g). A ausência de efeito do OEAT, demonstra que o mesmo não resulta em impactos negativos sobre os parâmetros de sobrevivência e crescimento de *M. rosenbergii*.

Palavras-chave: aditivo alimentar, camarão de água doce, juvenis.

ESSENTIAL OIL OF *Aloysia triphylla* ON THE DIET OF *Macrobrachium rosenbergii*: EFFECTS ON GROWTH PERFORMANCE

ABSTRACT

In the past two decades, several studies have reported positive results from the use of plant essential oils (EO) as a feed additive in various animal species. Recently, these nutritional alternatives have been evaluated and reported in fish production and, although they are still scarce in prawn production, the use of EO has been studied in order to increase resistance to diseases and prevent outbreaks, as well as to improve growth and animal welfare. Therefore, the objective of this experiment was to evaluate the use of the essential oil of *Aloysia triphylla* (EOAT) in the diet of *Macrobrachium rosenbergii* and its effects on productive performance. Juveniles of *M. rosenbergii* (0.396 ± 0.185 g; 3.062 ± 0.608 cm) were fed for 50 days with diets containing different doses of EOAT (0.0 - control, 1.0, 2.0 and 3.0 mL of EOAT diet / kg; with five repetitions). After the experimental period, the effects of EOAT on survival were verified, which remained above 84% for all treatments. There was no effect of treatments for weight gain (294.89, 286.77, 289.19 and 318.64%, respectively), specific growth rate (2.74, 2.75, 2.71 and 2.86% / day), body condition factor (2.75, 2.93, 3.02 and 2.90 g / cm³) and feed conversion rate (2.36, 2.44, 2.52 and 2.23 g/g). The lack of effect of the EOAT, demonstrates that it does not result in negative impacts on the parameters of survival and growth of *M. rosenbergii*.

Keywords: food additive, freshwater prawn, juveniles.

A produção mundial de aquicultura em 2016 foi de 80,0 milhões de toneladas de animais aquáticos sendo 54,1 milhões de toneladas de peixes, 17,1 milhões de toneladas de moluscos, 7,9 milhões de toneladas de crustáceos e 938.500 toneladas de outros animais aquáticos. Entre os produtos da aquicultura, o camarão *M. rosenbergii* é uma espécie importante em muitos países devido ao seu alto valor comercial e, também, devido ao fato de se encontrar amplamente disperso em muitas áreas tropicais e subtropicais do mundo (NEW, 2002).

Com o intuito de melhorar a eficiência econômica e o desempenho produtivo na aquicultura, muitos estudos têm investigado o potencial de promotores de crescimento, como antibióticos e agroquímicos (SANTOS et al., 2009). Dentro deste cenário, o interesse por aditivos derivados de plantas tem-se intensificado nos últimos anos, e bons resultados para peixes já foram relatados com óleos essenciais, como óleo de orégano (ZHENG et al., 2009); extrato etanólico de chá verde (HWANG et al., 2013); gengibre (KANANI et al., 2014); óleo de *Aloysia triphylla* (ZEPPENFELD et al., 2014) e óleo de *Lippia alba* (SACCOL et al., 2013).

Os óleos essenciais são considerados uma das mais importantes matérias-primas para a indústria alimentícia, farmacêutica e de perfumaria. Possuem peso molecular baixo e são complexos por serem substâncias voláteis e lipofílicas, além disso, são constituídas por moléculas de natureza terpênica (MORAIS, 2009; GOMES et al., 2011).

O arbusto *Aloysia triphylla*, da Família Verbenaceae, possui folhas e flores aromáticas (MORGAN, 1997), sendo uma erva originária do Chile, com propriedades adstringentes e aromáticas, utilizada na culinária como condimento e na Europa como aromatizante de ambientes. Além disso, possui propriedade bactericida e inseticida (LORENZI e MATOS, 2008). A utilização do óleo essencial e a elevada demanda da indústria farmacêutica e cosmética proporcionam maior interesse no cultivo da espécie (CZEPACK e CRUCIOL, 2003). Apesar de relatos dos seus benefícios para peixes e algumas espécies de camarões, não há trabalhos relatando o uso do OEAT para a espécie *M. rosenbergii*.

Para acompanhar o desenvolvimento da carcinicultura, é necessário investigar e estabelecer medidas para melhorar o desempenho zootécnico dos animais e o uso desses produtos naturais podem trazer efeitos positivos. Sendo assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o desempenho zootécnico de juvenis de *M. rosenbergii* alimentados com dietas suplementadas com diferentes doses de OEAT.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Material vegetal e extração de óleo essencial

O óleo essencial de *Aloysia triphylla* (OEAT) foi obtido por destilação a vapor de folhas frescas por 3h em aparelho de Clevenger (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007) e armazenado a - 4°C até sua utilização. O OE foi analisado em um GC Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massas 5975C com uma coluna capilar de sílica fundida não polar HP5-MS (5% fenil - 95% methylsiloxane, 30 mx 0,25 mm id x 0,25 mm espessura da película) e EI-MS de 70 eV. Parâmetros de análise - gás carreador: He (1 mL min⁻¹); entrada dividida: 1:100; temperatura do injetor e do detector: 250°C; Programa de temperatura: 40°C por 4 min e 40°C - 320°C a 4°C min⁻¹. Os componentes da OE foram identificados por meio da comparação dos espectros de massa e índice de retenção de Kovats com os dados da literatura (NIST, 2010). A análise quantitativa foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent 7890A equipado com um detector de ionização de chama, usando uma coluna com os mesmos recursos e programa descritos acima, exceto a injeção no modo sem divisor e as temperaturas do injetor e detector a 300 °C. A amostra de OE foi injetada em triplicata e a porcentagem relativa dos componentes foi estimada pela integração da área do pico obtida a partir dos cromatogramas FID. Os detalhes da extração de OE das folhas frescas e análises de composição foram relatados em Zeppenfeld et al. (2016).

4.2.2 Animais e Delineamento Experimental

Juvenis de *Macrobrachium rosenbergii* (n = 400) foram obtidos do Laboratório de Carcinicultura da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, no qual foram mantidos durante o período de aclimatação (7 dias) em tanques circulares (200L, densidade de 50 camarões / m²), com filtração mecânica e biológica, alimentados com a dieta controle.

O delineamento experimental foi constituído por vinte tanques (100L com 20 camarões / tanque), com sistema de recirculação de água, aeração e controle de temperatura sob fotoperíodo de 12 horas-luz/ 12 horas-escuro. Os camarões utilizados no experimento apresentaram peso e comprimento iniciais de $0,396 \pm 0,185\text{g}$ e $3,062 \pm 0,608\text{cm}$, respectivamente (média \pm DP). Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados e controlados conforme relatado por Ballester et al. (2018), os valores foram os seguintes (média \pm DP): temperatura ($29,12 \pm 1,46^\circ\text{C}$), pH ($7,97 \pm 0,27$), oxigênio dissolvido ($6,47 \pm 0,54\text{ mg/L}$), nitrogênio amoniacal total ($0,047 \pm 0,030\text{ mg N/L}$), nitrito ($0,035 \pm 0,044\text{ mg/L}$), nitrato ($4,453 \pm 4,377\text{ mg/L}$), alcalinidade ($83,0 \pm 7,51\text{ mg CaCO}_3/\text{L}$) e dureza ($84,0 \pm 22,0\text{ mg CaCO}_3/\text{L}$).

As unidades experimentais (n=20) foram então divididas em quatro grupos experimentais com as seguintes dietas: 0,0 (controle), 1,0, 2,0 e 3,0 mL de OEAT por kg de dieta (30% de proteína bruta (MITRA, CHATTOPADHYAY E MUKHOPADHYAY, 2005; REED e D' ABRAMO, 1989) (Tabela 4). Para a preparação das dietas experimentais, os ingredientes sólidos foram moídos (0,8 mm) em um moinho de martelos e, posteriormente, misturados de acordo com a formulação apresentada na Tabela 4 para processamento. Os peletes foram fabricados em uma peletizadora experimental pré-umedecendo a mistura com água a uma temperatura de 35 °C. Após a peletização, os péletes (1 mm) foram secos em estufa de ar forçado por 24 horas a 45°C e a ração foi armazenada sob refrigeração para uso posterior. Os camarões foram alimentados, durante 50 dias, três vezes ao dia (9:30 h, 14:30 h, e 20:30 h) com taxa de alimentação inicial equivalente a 15% da biomassa. A quantidade de ração era ajustada diariamente com base no consumo. Os tanques foram sifonados para remover os alimentos e fezes não consumidos 30 minutos antes da alimentação.

Tabela 4. Ingredientes e composição das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dieta			
	Controle	OEAT 1,0	OEAT 2,0	OEAT 3,0
Milho moído	41,98	41,98	41,98	41,98
Farinha de peixe	25,00	25,00	25,00	25,00
Farelo de soja	25,00	25,00	25,00	25,00
Óleo de soja	5,00	4,90	4,80	4,70
Amido	2,00	2,00	2,00	2,00
Suplemento vitamínico e mineral*	1,00	1,00	1,00	1,00
Hidroxitolueno butilato (BHT)	0,02	0,02	0,02	0,02
OEAT**	0,00	0,10	0,20	0,30
Total	100,0	100,0	100,0	100,0
Composição centesimal				
Energia (kcal/g)	4,490	4,500	4,450	4,430
Extrato Etéreo (%)	4,85	4,77	5,10	5,18
Umidade (%)	4,68	4,52	4,79	4,54
Matéria seca (%)	95,32	95,48	95,21	95,46
Proteína bruta (%)	30,00	30,00	30,00	30,00
Cinza (%)	9,23	8,21	10,24	10,05
Fibra Bruta (%)	4,19	4,35	3,98	4,19
ENN*** (%)	51,73	52,67	50,68	50,58

* Suplemento vitamínico e mineral - vitamina (níveis de garantia por kg): 16875 UI de vitamina A, 3375 UI de vitamina D3, 200 UI de vitamina E, 6,7 mg de vitamina K3, 120 mg de vitamina B, 36 mg de vitamina B2, 25,5 mg de vitamina B6, 45 mcg vitamina B12, 1200 mg de vitamina C, 11,2 mg de ácido fólico, 67,5 mg de ácido pantotênico, 170 mg de ácido nicotínico, 1,68 mg de biotina, 265 mg de inositol e mineral (níveis de garantia por kg): 65 mg de ferro, 13,8 mg de cobre, 150 mg de zinco, 85 mg de manganês, 0,35 mg de cobalto, 1,3 mg de iodo e 0,4 mg de selênio. **OEAT (óleo essencial de *Aloysia triphylla*: a porcentagem corresponde a 0,00, 1,00 2,00 e 3,00mL / kg de OEAT. *** Extrativo não nitrogenado.

4.2.3 Parâmetros de desempenho

Após o período experimental, os parâmetros de sobrevivência e crescimento dos animais foram avaliados. Os camarões foram medidos com paquímetro digital 402 (King Tools®) e pesados (Analytical Scale AY 220; Marte®) nos dias 0 e 50 do experimento para avaliação do peso final, ganho de peso (GP), taxa de conversão alimentar (TCA), taxa de crescimento específica (TCE) e comprimento total (medido pela distância linear entre a extremidade do rostro até a ponta do telson) e padrão (distância linear da margem posterior da órbita ocular até a base do telson), respectivamente. Esses parâmetros foram calculados da seguinte forma:

- Sobrevivência (%) = (número final de camarões / número inicial de camarões) x 100;
- Ganho de peso (%) = ((peso final - peso inicial) / peso inicial) x 100;
- Taxa de crescimento específica (TCE% por dia) = [(peso final - peso inicial) / dias do experimento] x 100;
- Fator de condição corporal = [peso total (g) / [comprimento padrão (cm) ^ 3]] x 100;
- Taxa de conversão alimentar (TCA) = (alimento consumido, g) / (ganho de peso, g).

4.2.4 Declaração de ética

Estudos com invertebrados não requerem autorização do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal tanto da Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE) quanto da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.2.5 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). A homocedasticidade e homogeneidade entre os grupos foram avaliadas através dos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Os dados que mostrarem variâncias homogêneas foram comparados usando uma análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software Statistica Software 7.0 (Stat Soft, Tulsa, OK, EUA) e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Desempenho zootécnico

A sobrevivência dos camarões não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 5). Além disso, não houve diferenças significativas no ganho de peso, taxa

de crescimento específico e outros parâmetros zootécnicos ($P > 0,05$) dos camarões alimentados com dietas contendo OEAT em relação ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5. Desempenho de crescimento e sobrevivência do camarão *Macrobrachium rosenbergii* alimentado com dietas contendo diferentes doses de óleo essencial de *Aloysia triphylla*

	Dieta (mL OEAT por kg de dieta)			
	0,0	1,0	2,0	3,0
Sobrevivência (%)	87,14 ± 9,31	85,71 ± 10,10	84,29 ± 9,31	87,14 ± 10,59
Peso final (g)	1,56 ± 0,17	1,57 ± 0,08	1,54 ± 0,11	1,66 ± 0,12
Comprimento final padrão (cm)	3,84 ± 0,15	3,73 ± 0,15	3,71 ± 0,08	3,85 ± 0,05
Ganho de peso (%)	294,89 ± 44,03	296,77 ± 20,47	289,19 ± 28,84	318,64 ± 29,60
TCE (% por dia)	2,74 ± 0,21	2,75 ± 0,10	2,71 ± 0,15	2,86 ± 0,14
Fator de condição (g/cm ³)	2,75 ± 0,16	2,93 ± 0,24	3,02 ± 0,15	2,90 ± 0,21
TCA (g/g)	2,36 ± 0,24	2,44 ± 0,27	2,52 ± 0,17	2,23 ± 0,22

Os valores são expressos como a média ± desvio padrão (n = 5, P < 0,05). TCE = taxa de crescimento específica, TCA = taxa de conversão alimentar. Os comprimentos totais e pesos iniciais foram os seguintes, respectivamente: 3,062 ± 0,608 cm e 0,396 ± 0,185 g.

4.4 Discussão

Ainda são escassas as informações sobre uso de óleos essenciais no desempenho zootécnico de camarões, porém, há alguns estudos utilizando extratos vegetais em dietas para promover crescimento e eficiência alimentar em invertebrados que têm sido relatados nas últimas décadas, como para o *Penaeus indicus* (IMMANUEL et al., 2004), abalone *Haliotis discus hannai* (LEE et al., 2001), onde Obosan e *R. communis*, respectivamente, trouxeram efeitos positivos para o desempenho zootécnico. Para *Litopenaus vannamei* (WANG et al., 2017) avaliou-se *Rhodiola rosea* na dieta e não foram verificadas diferenças significativas para os parâmetros de desempenho, assim como no presente trabalho.

Alguns estudos relatam os efeitos do uso do óleo essencial de *A. triphylla* para *Oreochromis niloticus*, onde os autores não relatam impacto em relação à sobrevivência, entretanto, observaram um efeito linear positivo com a suplementação nos parâmetros de peso final, ganho de peso e taxa de crescimento específico (DE SOUZA et al., 2019). Por outro lado, o mesmo óleo não causou alterações nos parâmetros zootécnicos de zebrafish, *Danio rerio* (ZAGO et al., 2018), assim como no presente estudo. Cagol et al. (2020) também não observaram efeitos sobre os parâmetros zootécnicos para *M. rosenbergii* testando a adição do óleo essencial de *Lippia alba*, apesar de terem relatado impactos positivos nas atividades da glutathiona peroxidase e glutathiona-S-transferase. Além disso, neste mesmo estudo foi verificado que a atividade da enzima superóxido dismutase foi maior nos hepatopâncreas de camarões que receberam 2,0 mL de dieta OELA / kg em comparação com aqueles alimentados com 1,0 mL de OELA / kg dieta.

A sobrevivência no presente estudo foi superior à relatada por Zhou et al. (2007) para juvenis de *L. vannamei* (42 a 61%). Ainda sobre a mesma espécie, Ly et al. (2019) testaram diferentes dosagens de um ácido orgânico, o diformiato de potássio, e uma dieta comercial, e obtiveram taxas de sobrevivência superiores a do presente trabalho para as dietas contendo dosagens de diformiato de potássio (93,33 a 100%), porém, também observaram uma taxa de sobrevivência inferior, utilizando a dieta comercial (73,33%).

O fator de condição corporal verificado na pesquisa atual foi adequado, e também melhor, do que a relatada por Murphy et al. (2012), além disso, pode ser comparável a relatos anteriores para *M. rosenbergii* (D'ABRAMO E SHEEN, 1994; NAIK, 1998). Segundo a FISH BREEDING ASSOCIATION (2003), um fator de condição $< 1,8$ indica condições precárias de bem-estar, enquanto um fator de condição > 2 indica que os peixes estão em bom estado fisiológico, além disso, o fato de condição deve permanecer constante, independentemente do tamanho que possa vir a ter, em um determinado período (CARMO et al., 2008).

A composição química de cada óleo essencial pode ser diferente e resultar em diferenças qualitativas e quantitativas decorrentes dos quimiotipos distintos, fatores genéticos, origem, macro e micronutrientes do solo, local de extração dos óleos, método de extração entre outros (NABRDALIK E GRATA, 2016). Os principais componentes do OEAT encontrados por Souza et al. (2017) foram α -citral (39,91%), E-carveol (25,36%) e limoneno (21,52%) enquanto Souza et al. (2016) teve como principais constituintes o geranial (28,97%), neral (16,12%), β -cariofileno (8,50%).

Sendo assim, a composição química de cada OE está relacionada com a genética da planta que pode interferir no potencial anestésico, sendo ainda influenciada por fatores abióticos, tais como temperatura, pluviosidade, ventos, tipo de solo, sazonalidade entre outros (FIGUEIREDO, 2008; SILVA et al., 2012). Além disso, ainda são necessárias pesquisas relacionadas aos parâmetros bioquímicos e fisiológicos do OEAT para a espécie *M. rosenbergii*.

4.5 Conclusão

A adição do óleo essencial *A. triphylla* na dieta para juvenis de *M. rosenbergii* não causou prejuízos no desempenho zootécnico, no entanto, é necessária realização de estudos adicionais no que se refere a parâmetros bioquímicos e fisiológicos para melhor compreensão de seus efeitos para o *M. rosenbergii*.

4.6 Referências

BALLESTER, E. L. C., MAURENTE, L. P. B., HELDT, A., e DUTRA, F. M. Vitamin and mineral supplementation for *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc system. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 46, p. 855-859. 2018. <http://dx.doi.org/10.3856/vol46-issue4-fulltext-25>.

CAGOL, L.; BALDISSEROTTO, B.; BECKER, A.G.; SOUZA, C.F.; HEINZMANN, B.M.; CARON, B. O.; LEONE, F.A.; SANTOS, L.D.; BALLESTER, E.L.C. Essential oil of *Lippia*

alba in the diet of *Macrobrachium rosenbergii*: effects on antioxidant enzymes and growth parameters. **Aquaculture Research**. 2020. doi: 10.1111/are.14569.

CARMO, J. L. D.; FERREIRA, D.A.; SILVA JUNIOR, R.F.; SANTOS, R.M.S.; CORREIA, E.S. Crescimento de três linhagens de tilápia sob cultivo semi-intensivo em viveiros. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 2, p. 20- 26, 2008.

CZEPACK, M.P.; CRUCIOL, C.A.C. Produtividade e composição do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) STAPF) em diferentes arranjos espaciais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS: DIAGNÓSTICO E PERSPECTIVAS, 2 ed. 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico, 2003. p.34-36

D'ABRAMO, L. R. AND SHEEN, S. S., "Nutritional requirements, feed formulation and feeding practices for intensive culture of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*," Reviews in **Fisheries Science**, Vol. 2, pp. 1-21. 1994.

DE SOUZA, R. C., BALDISSEROTTO, B., MELO, J. F. B., DA COSTA, M. M., DE SOUZA, E. M., & COPATTI, C. E. Dietary *Aloysia triphylla* essential oil on growth performance and biochemical and haematological variables in Nile tilapia. **Aquaculture**, 734913. 2019. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734913.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2007). European Directorate for the Quality of Medicines, 6th ed, Strassbourg.

FIGUEIREDO, A.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, 23:213- 26. 2008.

FISH BREEDING ASSOCIATION. 2003 Technical Handbook. **Fish Breeding Association**, Israel, 106 p.

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, 36(1): 64-77, 2011.

HWANG, J.; SI-WOO LEE, S.; RHA, S.; YOON, S.; PARK, E.; HAN, K.; KIM, S. Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Aquaculture International**. 2013.

IMMANUEL, G., VINCYBAI, V. C., SIVARAM, V., PALAVESAM, A., e MARIAN, M. P. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth, and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. **Aquaculture**, 236, p. 53-65. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.033>.

KANANI, H.G.; NOBAHAR, Z.; KAKOOLAKI, S.; JAFARIAN, H. Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. **Fish Physiol. Biochem.**, 40: 481-490, 2014.

LEE, S.M.; PARK, C.S.; KIM, D.S. Effects of dietary herbs on growth and body composition of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* **J. Korean Fish. Soc.**, 34 (2001), pp. 570-575

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 544p. 2008.

LY, M.A.; LIOU, C.H.; CHENG, A.C.; Dietary potassium diformate (Formi) supplementation on juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) diets for growth and survival support. **Journal of Applied Biosciences**, 2019.

MITRA, G., CHATTOPADHYAY, D. N., e MUKHOPADHYAY, P. K. Nutrition and feeding in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* farming. **Aqua Feeds Formulation Beyond**, 2, p. 17-19. 2005.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, 27(2): 4050-4063, 2009.

MORGAN, R. **Enciclopedia das Ervas e Plantas Mediciniais. Doença, aplicações**, 339 descrição e propriedades. Ed. Hemus, 555. 1997.

NABRDALIK, M.; GRATA, K. Antibacterial activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil against Gram-negative bacteria, **Postępy Fitoter.** 17, 80–86. 2016.

NAIK, A. T. R., “**Studies on partial replacement of fishmeal by soya flour in the diets of Freshwater prawn and carps,**” M.F.Sc. Thesis, University of Agricultural Sciences, Bangalore, India. 1998.

NIST/EPA/NIH, **Mass spectral library and search/analysis programs**. John Wiley and Sons, Hoboken, EUA. 2010..

REED, L., e D’ABRAMO, L. R. A standard reference diet for crustacean nutrition research. III. Effects on weight gain and amino acid composition of whole body and tail muscle of juvenile prawns *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 20, p. 107-113. 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1989.tb00562.x>.

SACCOL, E. M. H., J. UCZAY, T. S. PÊS, I. A. FINAMOR, G. M. OURIQUE, A. P. K. RIFFEL, D. SCHMIDT, B. O. CARON, B. M. HEINZMANN, S. F. LLESUY, R. LAZZARI, B. BALDISSEROTTO e M. A. PAVANATO. Addition of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, 416-417: 244-254, 2013.

SANTOS, E.L., LUDKE, M.C. e LIMA, M.R. Extratos vegetais como aditivos em rações para peixes. **Rev. Electron. Comun. Inf. Inov. Saude**, 6: 789–800. 2009.

WANG, Y., LIANG, J.-P., DUAN, Y.-F., NIU, J., WANG, J., HUANG, Z., e LIN, Z.-H. Effects of dietary *Rhodiola rosea* on growth, body composition, antioxidant capacity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal conditions and combined stress of low-salinity and nitrite. **Aquaculture Nutrition**, 23, p. 548-559. 2017. <https://doi.org/10.1111/anu.12422>.

ZAGO, D. C.; SANTOS, A. C.; LANES, C. F. C.; ALMEIDA, D. V.; KOAKOSKI, G.; DE ABREU, M. S.; ZEPPEFELD, C.C.; HEINZMANN, B. M.; MARINS, L.F.; BALDISSEROTTO, B.; BARCELLOS, L.J.G.; CUNHA, M. A. (2018). *Aloysia triphylla* in the zebrafish food: effects on physiology, behavior, and growth performance. **Fish Physiology and Biochemistry**, 44(2), 465–474. doi:10.1007/s10695-017-0446-0

ZEPPEFELD, C. C., HERNÁNDEZ, D. R., SANTINÓN, J. J., HEINZMANN, B. M., DA CUNHA, M. A., SCHMIDT, D., e BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Aloysia triphylla* as

feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, 22, p. 933-940. 2016. <https://doi.org/10.1111/anu.12311>.

ZEPPENFELD, C.C. et al. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture**, 418-419: 101-107, 2014.

ZHENG, Z.L.; TAN, J.Y.W.; LIU, H.Y; ZHOU, X.H.; XIANG, X.; WANG, K.Y. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, 292(3-4): 214-218, 2009.

ZHOU, Z.; DING, Z.; HUIYUAN, L. V. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38 (2), p. 296-301, 2007.

5 EFEITO DO POTENCIAL ANESTÉSICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia triphylla* EM PÓS-LARVAS DE *Macrobrachium rosenbergii*

RESUMO

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento nos estudos que avaliam os efeitos da adição de óleos essenciais na dieta de organismos aquáticos. Além disso, uma melhor compreensão do potencial anestésico destes óleos é importante, principalmente quanto à sua utilização em

procedimentos de rotina na aquicultura. Desta forma, este estudo objetivou avaliar o potencial anestésico do óleo essencial de *Aloysia triphylla* (OEAT) em pós-larvas do camarão *Macrobrachium rosenbergii*. O delineamento experimental consistiu de seis concentrações de OEAT, em triplicata, com 10 animais (peso e comprimento médios \pm EPM $0,024 \pm 0,002$ g; $13,694 \pm 0,299$ mm, respectivamente) por réplica, nomeadas da seguinte forma: controle positivo (0 μ L OEAT), controle negativo (volume de etanol (3600 μ L); correspondente à maior concentração utilizada para diluir o OEAT), 150, 225, 300 e 450 μ L OEAT; e duas durezas totais da água (32 ou 68 mg CaCO₃/L). Em cada uma das concentrações de OEAT e durezas da água foram avaliados os tempos de indução a sedação e a anestesia, a recuperação e a mortalidade. Os resultados obtidos para os tempos de sedação, anestesia e, recuperação, independente da dureza da água, compreenderam um intervalo entre 113 e 1410 segundos. No entanto, na dureza 32 mg CaCO₃/L, foi observada uma alta mortalidade para os animais expostos às maiores concentrações de OEAT (300 μ L/L: 40% e 450 μ L/L: 80%) logo após o período de recuperação, enquanto na dureza de 68 mg CaCO₃/L não se observou qualquer mortalidade. Assim, para a menor dureza determinaram-se adicionalmente as concentrações letais CL10 e CL50 após os 30 minutos de recuperação onde, os valores foram, respectivamente, (em μ L/L): 195,34 e 325,43. De qualquer forma, a comparação entre as durezas da água na mesma concentração de OEAT e estágio de indução anestésica mostrou que em 68 mg CaCO₃/L, tanto a sedação quanto a anestesia, levam menos tempo para serem atingidas quando os animais foram expostos às menores concentrações de OEAT (150, 225 e 300 μ L/L). Em relação à recuperação, observou-se uma resposta variável entre as concentrações de OEAT e as durezas da água, mas o maior tempo necessário para a recuperação dos animais expostos à 450 μ L/L pode ajudar a explicar a sobrevivência destes na dureza de 68 mg CaCO₃/L. A utilização de OEAT nas concentrações testadas neste estudo, na menor dureza, não são recomendadas devido à mortalidade. No entanto, ao se aumentar a dureza da água, observou-se a sobrevivência total dos animais, bem como os tempos de sedação, anestesia e recuperação ficaram dentro da faixa ideal (entre 3 e 10 minutos) para a utilização deste OE como anestésico na aquicultura. Por fim, os mecanismos fisiológicos relacionados à interação entre os constituintes do OEAT e os íons divalentes, nomeadamente cálcio e magnésio, presentes em maior concentração em maiores durezas da água permanecem sem uma completa compreensão, necessitando, portanto, de estudos adicionais.

Palavras-chave: camarão de água doce, dureza da água, recuperação, sedação.

ANESTHETIC POTENTIAL EFFECT OF *Aloysia triphylla* ESSENTIAL OIL IN *Macrobrachium rosenbergii* POST-LARVAE

ABSTRACT

In recent years, there has been an increase in studies evaluating the effects of adding essential oils to the diet of aquatic organisms. In addition, a better understanding of the anesthetic potential of these oils is important, especially regarding their use in routine aquaculture procedures. Thus, this study aimed to evaluate the anesthetic potential of the essential oil of *Aloysia triphylla* (EOAT) in post-larvae of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. The experimental design consisted of six concentrations of EOAT, in triplicate, with 10 animals (mean weight and length \pm EPM 0.024 ± 0.002 g; 13.694 ± 0.299 mm, respectively) per replica, named as follows: positive control (0 μ L EOAT), negative control (volume of ethanol (3600 μ L); corresponding to the highest concentration used to dilute the EOAT), 150, 225, 300 and 450 μ L EOAT; and two total water hardnesses (32 or 68 mg CaCO₃/L). In each of the concentrations of EOAT and water hardness, the induction times to sedation and anesthesia, recovery and mortality were evaluated. The results obtained for the sedation, anesthesia and recovery times, regardless of the water hardness, included an interval between 113 and 1410 seconds. However, at 32 mg CaCO₃/L, a high mortality was observed for animals exposed to the highest concentrations of EOAT (300 μ L / L: 40% and 450 μ L / L: 80%) right after the recovery period, while at 68 mg CaCO₃/L, no mortality was observed. Thus, for the lowest hardness, lethal concentrations CL10 and CL50 were additionally determined after 30 minutes of recovery, where the values were, respectively, (in μ L / L): 195.34 and 325.43. Anyway, the comparison between the water hardness in the same concentration of EOAT and anesthetic induction stage showed that in 68 mg CaCO₃/L, both sedation and anesthesia, take less time to be reached when the animals were exposed to the smallest EOAT concentrations (150, 225 and 300 μ L/L). Regarding recovery, a variable response was observed between EOAT concentrations and water hardness, but the longer time required for the recovery of animals exposed to 450 μ /L can help explain their survival at 68 mg CaCO₃/L hardness. The use of OEAT in the concentrations tested in this study, in the lower hardness, are not recommended due to mortality. However, when increasing the water hardness, the animals' total survival was observed, as well as the sedation, anesthesia and recovery times were within the ideal range (between 3 and 10 minutes) for the use of this OE as anesthetic in the aquaculture. Finally, the physiological mechanisms related to the interaction between the constituents of the OEAT and the divalent ions, namely calcium and magnesium, present in greater concentration in greater water hardness, remain without a complete understanding, therefore requiring further studies.

Keywords: freshwater prawn, recovery, sedation.

5.1 Introdução

O *M. rosenbergii* é a espécie de camarão de água doce mais produzida no Brasil, e sempre foi considerada uma espécie que possui como principais características a rusticidade, precocidade, fecundidade e alta fertilidade. Essas características permitem que possua

facilidade em adaptar-se à criação em cativeiros, resistindo a mudanças físicas e químicas da água e variações climáticas (VALENTI, 1996). Apesar disso, tem sido observados comportamentos de canibalismo e defesa de território, fazendo com que os animais possam confrontar-se, o que resulta em danos teciduais. Assim, em procedimentos de rotina e manuseio desses animais, o uso de pequenas concentrações de anestésicos na água pode contribuir para o seu bem-estar (AKBARI et al., 2010).

Óleos essenciais são considerados boas alternativas ambientais, por serem altamente voláteis, além de não deixarem resíduos tóxicos (PARK et al., 2011). Estudos com óleos essenciais têm sido realizados com crustáceos como *Homarus americanus* e *Carcinus maenas* (HUNTSBERGER, 2012), *Litopenaeus vannamei* (PARODI et al., 2012) e *Macrobrachium rosenbergii* (COYLE et al., 2005; SAYDMOHAMMED e PAL, 2009), principalmente para utilização em condições de estresse ou como anestésicos, podendo ajudar a minimizar e evitar possíveis efeitos negativos (COYLE et al., 2005; MARICCHIOLO e GENOVESE, 2011).

O arbusto *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton (Verbenaceae) cresce naturalmente na América do Sul e no final do século XVII foi introduzido na Europa, mas também pode ser encontrado em outros países do norte da África, Índia e América do Norte (CARNAT et al., 1999; OLIVA et al., 2010; SANTOS-GOMES et al., 2005). Suas folhas e flores têm propriedades aromáticas e são usadas na medicina popular para tratar a insônia e a ansiedade, como analgésico e sedativo, e tempero alimentar (MORGAN, 1997; OLIVA et al., 2010; VALENTÃO et al., 2002; ZAMORANO-PONCE et al., 2006). O óleo essencial (OE) de *A. triphylla* demonstrou, em peixes e camarões, eficácia anestésica e capacidade de minimizar algumas alterações nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos provocados pelo manuseio e transporte (GRESSLER et al., 2014; PARODI et al., 2012, 2014, 2016; ZEPPENFELD et al., 2014).

Alguns cuidados com a qualidade da água são necessários ao se avaliar a eficácia dos anestésicos. Trabalhos já relatam influências de parâmetros de qualidade da água, como a temperatura: para a capacidade anestésica do óleo-de-cravo para peixes (MYLONAS et al., 2015); a ação combinada de salinidade e temperatura também influenciaram nos tempos de indução e recuperação do camarão *Penaeus semisulcatus* (SOLTANI et al., 2004). Sendo assim a resposta dos anestésicos varia conforme a concentração utilizada, fatores ambientais, características biológicas, dentre outros aspectos (ROSS e ROSS, 2008). Visto que a dureza total é uma variável importante para o camarão de água doce e alguns processos fisiológicos, como a ecdise, dependem da disponibilidade de íons cálcio (Ca) e magnésio (Mg) (BROWN,

1991), o objetivo do presente estudo foi verificar o potencial anestésico do óleo essencial de *A. triphylla* em pós-larvas de *M. rosenbergii* e o efeito da dureza total da água sobre este potencial.

5.2 Material e Métodos

Foram realizados dois testes, no primeiro (Teste 1) foi avaliado a indução ou eficiência anestésica do OE de *A. triphylla*, onde observou-se uma alta mortalidade de pós-larvas de *M. rosenbergii*, o que direcionou as pesquisas a um segundo teste (Teste 2) em busca de mais respostas. Assim, considerando-se que no primeiro teste a dureza da água foi de 32 mg CaCO₃/L (adequado para o cultivo da espécie) e na literatura tem sido reportado um efeito dos parâmetros da água sobre a eficiência anestésica de diversos compostos onde, em estudos com peixes, o Ca e Mg exerce um efeito protetor sobre o tecido epitelial, no segundo teste dobrou-se a dureza total da água (de 32 para 68 mg CaCO₃/L). Esta alteração objetivou, portanto, verificar se uma maior presença de íons Ca⁺² e Mg²⁺ na água, poderia exercer algum efeito de proteção sobre os animais em relação aos componentes do OE de *A. triphylla*. Sendo assim, o trabalho ficou organizado da seguinte forma:

Teste 1: Avaliação da eficiência anestésica do óleo essencial (OE) de *A. triphylla* em pós-larvas de *M. rosenbergii* e determinação das concentrações ideais para procedimentos de transporte e biometria.

Teste 2: Efeito da dureza da água no potencial anestésico do óleo essencial (OE) de *A. triphylla* em pós larvas de *M. rosenbergii*.

5.2.1 Material vegetal e extração de óleo essencial dos testes 1 e 2

As plantas de *A. triphylla* foram cultivadas e amostradas na cidade de Frederico Westphalen (RS), Brasil. A identificação foi feita pelo Dr. Gilberto Dolejal Zanetti, botânico do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM, e um espécime de voucher (SMDB n° 11169) foi depositado no herbário do Departamento de Biologia (UFSM). Os detalhes da extração de OE a partir das folhas frescas e as análises de composição foram relatadas em Zeppenfeld et al. (2016). Descrevendo, de forma breve, a extração de OE *A. triphylla* foi feita através de um processo de hidrodestilação, o qual foi realizado com o auxílio de um aparelho Clevenger (período de 3h), e a composição do OE foi obtida através de cromatógrafo de corrente iônica total, através de cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo a gás Agilent-6890 acoplado a um detector de massa Agilent 5973. O OE foi armazenado a - 20°C

em frascos de vidro âmbar, a sua densidade foi de aproximadamente 0,9 g/mL, e os principais componentes foram β -citral (207,8 g/kg) e α -citral (294,1 g/kg).

5.2.2 Animais e delineamento experimental dos testes 1 e 2

As pós-larvas de *M. rosenbergii* ($0,024 \pm 0,002$ g; $13,694 \pm 0,299$ mm; média \pm erro padrão da média, EPM; n total = 360 animais) foram obtidas do Laboratório de Carcinicultura da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, e mantidas durante o período de aclimação (sete dias) em tanques circulares (200L, densidade de 50 camarões/m²) com filtração mecânica e biológica, para posteriormente serem transferidas para as unidades experimentais. Os parâmetros de qualidade da água durante o período de aclimação permaneceram dentro da faixa recomendada para espécie, conforme relatado por Ballester et al. (2018).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, totalizando 36 unidades experimentais (aquários de 500mL), divididas em seis concentrações (em triplicata, n = 10 animais por replicata) de OE de *A. triphylla* (em μ L/L): 0 (controle positivo), 150, 225, 300 ou 450, previamente diluídas em etanol (1:10, v/v), e o grupo controle negativo (concentração de etanol de 3600 μ L/L, o que equivale à diluição usada para a maior concentração de OE) e duas durezas totais da água (32 e 68 mg CaCO₃/L (ajustada por meio da adição de carbonato de cálcio, CaCO₃ P.A).

5.2.3 Indução anestésica, recuperação e taxa de mortalidade de pós-larvas de *M. rosenbergii* expostas a diferentes concentrações de óleo essencial de *A. triphylla* (OEAT) e durezas da água.

Os tempos de indução à sedação e anestesia, bem como a recuperação, foram avaliados conforme descrito por Coyle et al. (2005), onde o estágio de sedação é caracterizado como uma perda parcial de equilíbrio e de reação ao estímulo ao toque. Na sequência, o estágio da anestesia está associado à completa perda de equilíbrio e à ausência de reação aos estímulos ao toque. Finalmente, o estágio de recuperação (em água sem anestésico) está completo quando o camarão recupera o controle do equilíbrio e atinge sua postura normal, uma posição ereta no fundo do tanque. O tempo máximo de observação para cada um dos estágios de anestesia e recuperação foi de 30 min, o qual foi registrado com o auxílio de um cronômetro digital. Em cada uma das concentrações de OEAT e durezas da água os animais foram utilizados uma única vez. A mortalidade dos camarões foi observada imediatamente após o tempo de recuperação ou até o tempo máximo de observação, sendo calculada por meio da seguinte equação: Mortalidade

(%) = (número final de animais mortos / número inicial de animais) x 100. Os dados de mortalidade foram utilizados para as determinações das concentrações letais, CL₁₀ e CL₅₀ após 30 min de recuperação.

5.2.4 Declaração de ética

Estudos com invertebrados não requerem autorização do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal tanto da Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE) quanto da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

5.2.5 Análises estatísticas

Todos os dados são expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A homocedasticidade e homogeneidade entre os grupos foram avaliadas através dos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Os dados exibiram variâncias homogêneas, e, portanto, as comparações entre os diferentes grupos experimentais e tempos de indução foram feitas usando ANOVA de duas vias, seguido pelo Teste de Tukey. A avaliação da atividade anestésica foi realizada por análise de regressão exponencial, polinomial ou linear (concentração x tempo de indução à anestesia; concentração x tempo de recuperação à anestesia) e pelo modelo matemático dos parâmetros Sigmoid-Four (concentrações letais, LC₁₀ e LC₅₀), utilizando o software Sigma ver 14.0 (P <0,05). O nível mínimo de significância foi estabelecido em P <0,05.

5.3 Resultados

Os tempos de indução aos estágios de sedação e anestesia diminuíram com o aumento das concentrações do OEAT independentemente da dureza da água (32 ou 68 mg CaCO₃/L) na qual os animais foram mantidos (Tabela 6). Já os tempos de recuperação para a maior dureza apresentaram um aumento significativo apenas na maior concentração de OEAT (450 µL/L). Houve alta mortalidade entre os animais expostos às maiores concentrações de OEAT na dureza 32 mg CaCO₃/L (300 µL/L: 40% e 450 µL/L: 80%) logo após o período de recuperação, enquanto na dureza de 68 mg CaCO₃/L não se observou qualquer mortalidade. A comparação entre as durezas da água na mesma concentração de OEAT e estágio de indução anestésica, mostrou que em 68 mg CaCO₃/L, tanto a sedação quanto a anestesia, levam menor tempo para serem atingidas quando os animais foram expostos às menores concentrações de OEAT (150, 225 e 300 µL/L). Em relação à recuperação, observou-se uma resposta variável entre as

concentrações de OEAT e as durezas da água, mas o maior tempo necessário para a recuperação dos animais expostos à 450 $\mu\text{L/L}$ pode ser um caminho para a explicar a sobrevivência destes na dureza de 68 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$.

5.4 Teste 1

Os dados de mortalidade determinados e demonstrados na Tabela 6 foram utilizados, também, para as determinações das concentrações letais, CL_{10} e CL_{50} após 30 min de recuperação, as quais estão representadas na Figura 3. Além disso, neste primeiro teste a dureza total da água foi de 32 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$, assim, as mesmas concentrações de OE foram novamente testadas em um segundo teste, mas com o dobro da dureza total, nomeadamente, 68 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$.

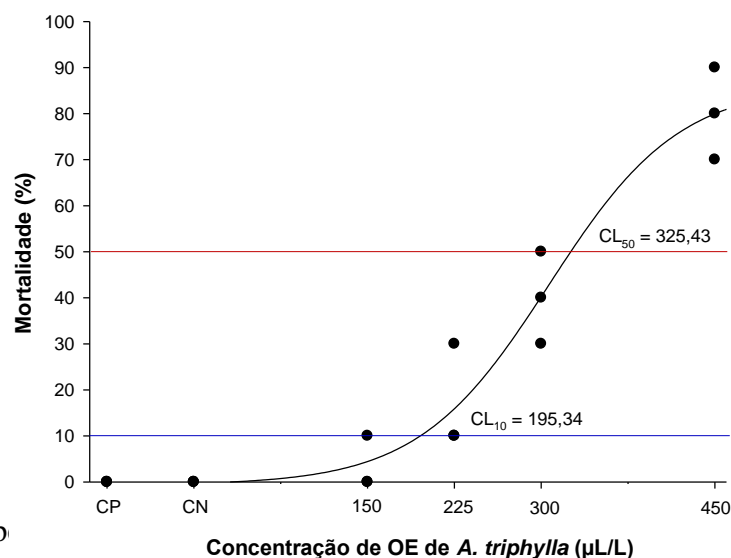


Figura 3. Regressão p e CL_{50} para pós-larvas de *M. rosenbergi* após 30 minutos de recuperação do teste de anestésico com exposição a diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de *A. triphylla* e dureza total da água (32 $\text{mg de CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) ($R^2:0,9532$; $F=95,0492$; $P=0,0001$; $f=-0,6575+ 86,9996 / (1+\exp(-(x-306,7483)/56,4656))$). CP: controle positivo (água), CN: controle negativo (etanol), $P<0,05$.

As concentrações letais CL_{10} e CL_{50} , neste teste, foram respectivamente (em $\mu\text{L/L}$ OE de *A. triphylla*): 195,34 e 325,43 $\mu\text{L/L}$ OE *A. triphylla*.

5.5 Testes 1 e 2

Um segundo teste de indução à anestesia foi realizado, alterando apenas a dureza total da água. No teste 2, independente da concentração de OE de *A. triphylla* utilizada, não se observou qualquer mortalidade, indicando, portanto, um possível efeito protetor do Ca e Mg. A concentração crescente de OEAT diminuiu proporcionalmente, independentemente da dureza total da água, os tempos necessários para indução à sedação e à anestesia (Figura 4). Por outro

lado, o tempo de recuperação mostrou um aumento proporcional (dependente da concentração) apenas em camarões mantidos em 68 mg CaCO₃/L. O etanol *per se* não produziu qualquer efeito anestésico, mesmo em uma concentração equivalente à diluição da maior concentração de OE testada. Os tempos de sedação e anestesia foram significativamente maiores nos animais mantidos na dureza da água de 32 mg CaCO₃/L do que naqueles mantidos em 68 mg CaCO₃/L.

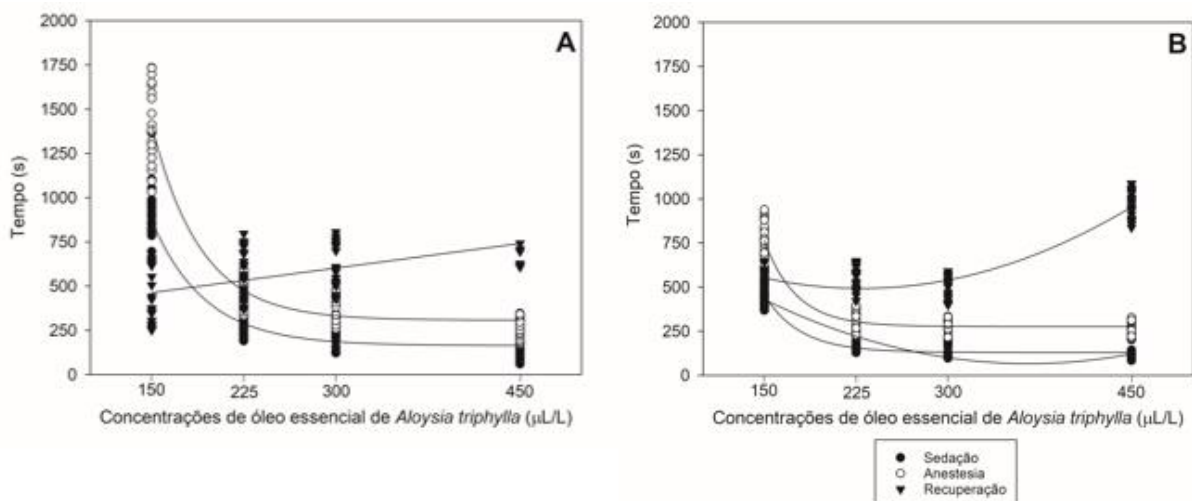


Figura 4. Tempo (em segundos) requeridos para indução e recuperação a partir da anestesia com o OEAT em pós-larvas de *M. rosenbergii* expostas a duas durezas da água (A, 32mg CaCO₃/L; B, 68mg CaCO₃/L). Equações: A) sedação ($y = 163,55 + 22519,43e^{(-0,02x)}$; $r^2 = 0,91$), anestesia ($y = 306,95 + 47274,35e^{(-0,02x)}$; $r^2 = 0,93$) e recuperação ($y = 323,77 + 0,93x$; $r^2 = 0,26$); B) sedação ($y = 129,53 + 52639,40e^{(-0,03x)}$; $r^2 = 0,92$), anestesia ($y = 276,23 + 149837,65e^{(-0,04x)}$; $r^2 = 0,91$) e recuperação ($y = 989,70 - 4,34x + 0,01x^2$; $r^2 = 0,85$).

Tabela 6. Tempos (em segundos) de indução à anestesia e recuperação e mortalidade de pós-larvas de *Macrobrachium rosenbergii* expostas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Aloysia triphylla* (OEAT) e durezas da água.

	Sedação		Anestesia		Recuperação		Mortalidade (%)	
Dureza da água (em mg CaCO ₃ /L)								
Concentração (µL/L OEAT)	32,0	68,0	32,0	68,0	32,0	68,0	32,0	68,0
150	872,83±23,53Aa	454,81±12,47Ab	1408,77±45,32Aa	761,24±21,50Ab	407,14±28,03Bb	528,90±14,66Ba	03	00
225	264,77±8,76Ba	152,00±4,11Bb	457,27±14,74Ba	302,00±12,16Bb	592,04±27,68Aa	553,14±15,22Ba	17	00
300	256,87±10,85Ba	151,38±9,52Bb	391,87±12,00Ba	293,90±8,74Bb	612,28±29,02Aa	494,38±13,48Bb	40	00
450	115,17±6,67Ca	112,67±4,27Ba	264,40±9,63Ca	261,90±8,89Ba	665,50±22,97Ab	961,95±17,10Aa	80	00

Valores expressos como média ± EPM. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações de óleo essencial de *Aloysia triphylla* (OEAT) no mesmo estágio de anestesia ou recuperação e mesma dureza da água (P<0,05). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as durezas da água na mesma concentração de OEAT e mesmo estágio de anestesia ou recuperação (P<0,05).

5.6 Discussão

Apesar de escassos, alguns trabalhos demonstram o potencial anestésico dos óleos essenciais em camarões, como é o caso do óleo de cravo testado para *Macrobrachium rosenbergii*, *Litopenaeus schmitti* e *Farfantepenaeus brasiliensis* (COYLE et al., 2005; MATULOVIC et al., 2014); *Aloysia triphylla* e *Lippia alba* para *Litopenaeus vannamei* (PARODI et al., 2012); e do composto isolado eugenol para *Macrobrachium rosenbergii* e *Fenneropenaeus indicus* (SAYDMOHAMMED e PAL, 2009; AKBARI et al., 2010).

Segundo Meade (1989) para se obter uma boa produtividade na aquicultura intensiva é necessário a manutenção dos parâmetros físicos e químicos da água. A dureza total da água por exemplo, está relacionada aos cátions divalentes presentes na água (Ca^{2+} e Mg^{2+} principalmente), que exercem um papel importante na regulação iônica interferindo na permeabilidade das membranas biológicas, evitando o fluxo difusivo e altas perdas iônicas para água (GONZALEZ et al., 1998). Na carcinicultura de água doce são indicadas concentrações de alcalinidade e dureza total acima de 30 mg CaCO_3/L para manter uma boa estabilidade do sistema tampão da água de cultivo (SÁ, 2012), além disso, este fator está associado a biodisponibilidade de cálcio necessários a ecdise (EGNA e BOYD, 1997).

Uma concentração anestésica eficiente deve minimizar os tempos de sedação, anestesia e recuperação (SOLTANI et al., 2004). No presente estudo, em ambas as durezas totais da água (32 e 68 mg de CaCO_3/L), observou-se que em 450 $\mu\text{L}/\text{L}$ de OEAT o tempo de indução anestésica foi inferior a 5 min (300s), o que é recomendado para anestesia adequada. No entanto, o tempo necessário para a recuperação da anestesia também é um parâmetro importante para definir se o anestésico pode ser utilizado nos procedimentos de aquicultura. Assim, para organismos aquáticos, o tempo adequado para recuperação deve ser menor que 10 min e não causar mortalidade. Em nosso estudo, no final da recuperação, todas as concentrações de OEAT causaram mortalidade nos camarões mantidos em 32 mg de CaCO_3/L (Tabela 6), indicando que essa dureza da água combinada com as concentrações de OEAT aqui utilizadas não são recomendadas para as pós-larvas de *Macrobrachium rosenbergii*. Além disso, embora a concentração de 150 $\mu\text{L}/\text{L}$ de OEAT no teste com dureza de 32 mg CaCO_3/L tenha mostrado uma menor taxa de mortalidade, o tempo de anestesia foi superior a 20 minutos, o que não é adequado.

Organismos aquáticos mantidos sob diferentes parâmetros de qualidade da água, como salinidade, pH, nível de oxigênio dissolvido, dureza total e temperatura da água, podem responder diferentemente a uma concentração anestésica específica (MCFARLAND, 1959;

SYLVESTER e HOLLAND, 1982). Isto se dá, principalmente, devido à capacidade dessas variáveis alterarem as propriedades farmacocinéticas de um fármaco, ou seja: uma rápida captação e absorção indica um curto tempo de indução anestésica, enquanto que a depuração e eliminação lenta significam um longo tempo de recuperação da anestesia (Z AHL et al., 2009). No presente estudo, o aumento da dureza total da água (de 32 para 68 mg CaCO₃/L) contribuiu diretamente para reduzir a mortalidade dos camarões, pois em 68 mg CaCO₃/L todos os animais sobreviveram após o período de recuperação, independente da concentração de OE de *A. triphylla* utilizada, indicando, portanto, um possível efeito protetor do Ca e Mg. Possivelmente o Ca + Mg e outras substâncias compartilhem a mesma via de transporte nas brânquias (NIYOGI E WOOD, 2004), então um aumento do Ca + Mg na água poderia reduzir a captação de alguns constituintes do óleo essencial, este fato já foi relatado com Cd por exemplo, onde o aumento de Ca + Mg compete pela mesma via e ocasionou uma redução da toxicidade do mesmo (HOLLIS et al., 2000).

Becker et al. (2015), avaliaram o potencial anestésico de diferentes substâncias, além de determinar o tempo de indução e concentrações ideais para manejo e transporte de juvenis de *L. vannamei*. E estes autores verificaram ao testar *Eucalyptus globulus*, que o tempo de indução e recuperação foram concentração-dependente, assim como no presente trabalho, ou seja, quanto maior a concentração, menores os tempos. Além disso os mesmos autores verificaram tempos recomendados de indução anestésica (<5 min) e recuperação (<10 min) com concentrações maiores do óleo essencial *E. globulus* (450, 675 e 1000 mg/L). No geral, para camarões, são indicadas concentrações mais elevadas para anestesia do que peixes, pois os anestésicos parecem atuar em diferentes receptores nos crustáceos (LEWBART e MOSLEY, 2012).

Os óleos essenciais podem ser constituídos das mesmas substâncias, porém com porcentagens diferentes, dessa forma o que caracteriza o óleo biologicamente é a diversidade e concentração desses compostos, cuja atuação pode ser atribuída a uma única substância ou a união destas, ou mesmo o antagonismo ou efeitos aditivos entre os diferentes compostos (SMITH et al., 2001; TROMBETTA et al., 2005; EDRIS, 2007).

A toxicidade observada no presente estudo deve ser investigada para entender os possíveis mecanismos envolvidos nesse processo, bem como, exatamente, quais íons presentes na dureza total da água interagem com os constituintes e efeitos fisiológicos do OE.

5.7 Conclusão

O óleo essencial de *A. triphylla* foi eficaz na indução da anestesia de pós-larvas de *M. rosenbergii*, porém, é necessário manter os animais em dureza total da água de 68 mg CaCO₃/L para evitar um possível efeito tóxico de OE *A. triphylla*. Além disso, o intervalo recomendado das concentrações de OE *A. triphylla* está entre 225 e 300 µL/L, onde o tempo de anestesia e recuperação permanece próximos de 5 e 10 min, respectivamente.

5.8 Referências

- AKBARI, S., KHOSHOD, M.J., RAJAIAN, H., AFSHARNASAB, M.. The use of eugenol as an anesthetic in transportation of with Indian shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) post larvae. **Turk. J. Fish. Aquatic. Sci.** 10, 423–429.2010.
- BALLESTER, E. L. C., MAURENTE, L. P. B., HELDT, A., e DUTRA, F. M. Vitamin and mineral supplementation for *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc system. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 46, p. 855-859. 2018. <http://dx.doi.org/10.3856/vol46-issue4-fulltext-25>.
- BECKER, A.J., JENSEN, L., GARCIA, L.O., SILVA, L.L., MONSERRAT, J.M., WASIELESKY JR, W., HEINZMANN, B.M., BALDISSEROTTO, B. **The efficacy of linalool on transportation and anesthesia of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae)**. FENACAM e LACQUA/SARA (WAS) '15 Meeting Abstract. 2015. <https://www.was.org/meetings/ShowAbstract.aspx?Id=38657>.
- BROWN, J. H.; WICKINS, J.F.; MACLEAN, M.H. The effect of water hardness on growth and carapace mineralization of juvenile freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. **Aquaculture**, v. 95, n. 3-4, p. 329-345, 1991.
- CARNAT, A.; CARNAT, A.P.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J.L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. **Fitoterapia** 70, 44–49. 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(98\)00016-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(98)00016-1).
- COYLE, S.D., DASGUPTA, S., TIDWELL, J.H., BEAVERS, T., BRIGHT, L.A., YASHARIAN, D.K. 2005. Comparative efficacy of anesthetics for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 36:282–290. 2005.
- EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Reserch**, 21:308-323. 2007.
- EGNA, S.; BOYD, C.E. **Dynamics of Pond Aquaculture**. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1997.
- GONZALES, R.J.; WOOD,C.M.; WILSON, R.W.; PATRICK, M.L.; BERGMAN, H.L.; NARAHARA, A.; VAL, A.L. Effects of water pH and calcium concentration on ion balance in fish of the Rio Negro, Amazon. **Physiological Zoology**, v.71, p. 15-22. 1998.
- GRESSLER, L.T.; RIFFEL, A.P.K.; PARODI, T.V.; SACCOL,E.M.H.; KOAKOSKI, G.; COSTA, S.T. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 1061-1072,2014.
- HUNTSBERGER, C. **Use of Injectable Eugenol for Euthanasia and Anesthesia of American Lobsters (*Homarus Americanus*) and Similar Species**. 35 f.
- LEWBART, G.A., MOSLEY, C. Clinical anesthesia and analgesia in invertebrates. **J. Exotic Pet Med.** 21(1), 59-70. 2012.
- MARICCHIOLO, G., GENOVESE, L. Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. **Open Marine Biology Journal**, 5:24-33. 2011.
- MATULOVIC, F.M. **Avaliação de óleos essenciais como anestésico em camarões marinhos, *Litopenaeus schmitti* e *Farfantepenaeus brasiliensis***. Seropédica, Rio de Janeiro.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, 60p. 2014.

MCFARLAND, W.N. A study of the effects of anesthetics on the behaviour and physiology of fishes. **Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas** 6, 23–55. 1959.

MEADE, J. **Aquaculture Management**. New York: AVI Book, 175p. 1989.

MORGAN, R. (1997) **Enciclopedia das Ervas e Plantas Medicinais. Doença, aplicações**, 339 descrição e propriedades. Ed. Hemus, 555.

MYLONAS, C.C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetic in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, 246, p. 467-481. 2005.

OLIVA, M.M.; BELTRAMINO, E.; GALLUCCI, N.; CASERO, C.; ZYGADLO, J.; DEMO, M. Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton from different regions of Argentina. **B. Latinoam. Caribe Pl.** 9, 29–37. 2010.

PARK, H.M.; KIM, J.; CHANG, K.S.; KIM, B.S.; YANG, Y.J.; KIM, G.H.; SHIN, S.C.; PARK, I.K. Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna* and aqueous residue. **Journal of Medical Entomology**. 48(2):405-410.2011.

PARODI, T.V., CUNHA, M.A., BECKER, A.G., ZEPPENFELD, C.C., MARTINS, D.I., KOAKOSKI, G., BARCELLOS, L.G., HEINZMANN, B.M., BALDISSEROTTO, B., Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish Physiol. Biochem.** 40, 323–334. 2014. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10695-013-9845-z>.

PARODI, T.V., CUNHA, M.A., HELDWEIN, C.G., DE SOUZA, D.M., MARTINS, A.C., GARCIA, L.O., WASIELESKY JR., W., MONSERRAT, J.M., SCHMIDT, D., CARON, B.O., HEINZMANN, B., BALDISSEROTTO, B. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** 155, 462–468. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.003>.

PARODI, T.V., DOS SANTOS, C.A., VERONEZ, A., GOMES, L.C., HEINZMANN, B.M., BALDISSEROTTO, B., 2016. Anesthetic induction and recovery time of *Centropomus parallelus* exposed to the essential oil of *Aloysia triphylla*. **Ciênc. Rural** 46 (12), 2142–2147. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160039>

ROSS, L.G., ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Blackwell Publishing Ltd. Oxford. UK. 2008.

SÁ, M. V. C. **Limnocultura: Limnologia para aquicultura**. Fortaleza: Editora UFC. 2012.

SANTOS-GOMES, P.C., FERNANDES-FERREIRA, M., VICENTE, A.M.S., Composition of the essential oils from flowers and leaves of Vervain [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton] grown in Portugal. **J. Essent. Oil Res.** 17, 73–78. 2005. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2005.9698835>.

SAYDMOHAMMED, M., PAL, A.K. Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture** 298, 162–167. 2009.

SOLTANI, M., MARMARI, G.H., MEHRABI, M.R., Acute toxicity and anesthetic effects of clove oil in *Penaeus semisulcatus* under various water quality conditions. **Aquaculture International**, 12:457–466. 2004.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAJA, A.; MOZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, p.2474-2478, 2005.

VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; BASTOS, M.L. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: a scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biol. Pharm. Bull.** 25, 1324–1327. 2002.

VALENTI, W. C. **Criação de camarões em águas interiores**. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina veterinária e Zootecnia, 1996.

ZAHL, I.H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O.B.; HANSEN, M.K.; Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) – Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, v. 295, p. 52-59, 2009.

ZAMORANO-PONCE, E.; MORALES, C.; RAMOSA, D.; SEPÚLVEDA, C.; CARES, S.; RIVERA, P.; FERNÁNDEZ, J.; CARBALLO, M.A. Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique. **Mutat. Res.** 603, 145–150. 2006.

ZEPPENFELD, C. C., HERNÁNDEZ, D. R., SANTINÓN, J. J., HEINZMANN, B. M., DA CUNHA, M. A., SCHMIDT, D., e BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, 22, p. 933-940. 2016. <https://doi.org/10.1111/anu.12311>.

ZEPPENFELD, C.C. et al. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture**, 418-419: 101-107, 2014.