



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



ÁTILA CLIVEA DA SILVA MARTINS

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO LIPÓICO NA RAÇÃO
DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)

Rio Grande – RS

2011

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

Potencial antioxidante do ácido lipóico na ração do camarão
***Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**

Átila Clivea da Silva Martins

Orientador: Dr. José María Monserrat

Co-Orientador: Dr. Wilson Wasielesky

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

Rio Grande - RS

Março – 2011

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	4
	DEDICATÓRIA	6
	AGRADECIMENTOS	7
	RESUMO	8
	ABSTRACT	9
1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	HIPÓTESES	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL.....	20
4.3	ANÁLISE DA ÁGUA.....	24
4.4	METODOLOGIA PARA INDUZIR HIPOXIA.....	24
4.5	DISSECAÇÃO DOS CAMARÕES.....	26
4.6	HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	28
4.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA-S- TRANSFERASE (GST).....	30
4.8	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	31
4.9	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	34
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	36
5	RESULTADOS	37
5.1	PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA.....	37
5.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA-S- TRANSFERASE (GST).....	37
5.2.1	Brânquias	37
5.2.2	Hepatopâncreas	39
5.3	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	41
5.3.1	Brânquias	41
5.3.2	Hepatopâncreas	43

5.4	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	45
5.4.1	Brânquia.....	45
5.4.2	Hepatopâncreas.....	47
5.5	PESO.....	49
6	DISCUSSÃO.....	50
7	CONCLUSÃO.....	56
8	REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplar de <i>Litopenaeus vannamei</i> utilizado nos ensaios.....	20
Figura 2a – Desenho experimental.....	22
Figura 2b – Desenho experimental.....	22
Figura 3 – Material para preparo da ração e ração com ácido lipóico.....	22
Figura 4 – Mistura de ração, ácido lipóico e água destilada.....	23
Figura 5 – Ração seca em estufa a 50°C.....	23
Figura 6 – Multiparâmetro YSI.....	24
Figura 7 – Distribuição dos grupos experimentais em normóxia e hipóxia.....	25
Figura 8 – Brânquia.....	26
Figura 9 – Retirada da brânquia.....	26
Figura 10 – Hepatopâncreas.....	26
Figura 11 – Papel alumínio etiquetados e amostras de brânquias e hepatopâncreas.....	27
Figura 12 – Balão de nitrogênio líquido.....	27
Figura 13 – Pesagem das amostras.....	28
Figura 14 – Homoneização das amostras.....	29
Figura 15 – Centrífuga.....	29
Figura 16 – Montagem da placa.....	30
Figura 17 – Espectrofluorímetro (Víctor 2, Perkin Elmer).....	31
Figura 18 – Diluição seriada para formação da curva padrão.....	33
Figura 19 – Aquecimentos dos tubos e banho-maria.....	33
Figura 20 – Remoção 150 µL da fase orgânica e adição a microplacas brancas para fluorescência.....	33
Figura 21 – Leitura em fluorímetro.....	34
Figura 22 – Leitura em fluorímetro a cada 5 minutos por 30 minutos.....	35
Figura 23 – Atividade da glutatona-S-transferase (GST) nas brânquias de <i>L. vannamei</i> em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140 mg por 1 kg de ração) após (A) 0,5 h; (B) 1 h; e (C) 4 h de re-oxigenação.....	38
Figura 24 – Atividade da glutatona-S-transferase (GST) em hepatopâncreas de <i>L. vannamei</i> em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140	

mg por 1 kg de ração) após: (A) 0,5 h; (B) 1 h; e (C) 4 h após re-oxigenação.....	40
Figura 25 – Quantificação da concentração de MDA em brânquias de <i>L. vannamei</i> em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140 mg por 1 kg de ração) após : (A) 0,5 h; (B) 1 h; e (C) 4 h de re-oxigenação.....	42
Figura 26 – Quantificação da concentração de MDA em hepatopâncreas de <i>L. vannamei</i> em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140 mg por 1 kg de ração) após : (A) 0,5 h; (B) 1 h; e (C) 4 h de re-oxigenação.....	44
Figura 27 – Capacidade antioxidante total em brânquias de <i>L. vannamei</i> em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140 mg por 1 kg de ração) após: (A) 0,5 h; (B) 1 h; e (C) 4 h de re-oxigenação.....	46
Figura 28 – Capacidade antioxidante total em hepatopâncreas de <i>L. vannamei</i> em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140 mg por 1 kg de ração) após: (A) 0,5 h; (B) 1 h; e (C) 4 h de re-oxigenação.....	48
Figura 29 – Ganho de peso do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentado com rações com diferentes concentrações de ácido lipóico.....	49

Dedicatória

Dedico esse trabalho a muitas pessoas que de alguma forma ajudaram e incentivaram-me, mas por não poder manter uma lista que cresceria a cada dia, vou ser bastante seletiva e dedicá-lo a cinco pessoas diretamente envolvidas, não apenas com que faço, mas em toda minha vida.

A Antônio Carlos Martins, meu pai, e Célia Santana, minha mãe, que com luta, mas principalmente com muita dedicação e amor, me deram a educação sem a qual eu não teria chegado a lugar algum. *Vocês dois são meu grande orgulho e eu quero que tudo o que eu faça em toda minha vida sejam provas de que o pouco que vocês acham que fizeram por mim, na verdade foi muito do que qualquer filho poderia querer. Vocês simplesmente me deram tudo e vão estar eternamente em tudo que eu fizer.*

A Carlos Martins e Carla Martins, meus irmãos, pelo compartilhamento do entusiasmo, pela motivação e pelo constante apoio que sempre me deram. *Vocês são maravilhosos, com alegria, paciência, incentivo e críticas que me dão sei que amanhã sempre será melhor que hoje, não importa o que aconteça.*

A Carlos Eduardo que está presente todos os dias mesmo longe, que rompeu e fez-me romper a barreira da distância, viajando horas para estarmos juntos. *Que é responsável por muitas risadas e por alguns dos dias mais felizes do ano. É quem me surpreende com atitudes inesperadas, quem tanto me faz rir por agir não naturalmente, quem eu admiro por ser tão igual e tão diferente de mim e termos vidas que caminham em velocidades tão semelhantes e por ter um sotaque português extremamente sexy.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Maria Monserrat.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wilson Wasielesky.

Ao Laboratório de Fisiologia Animal Comparada da Universidade Federal do Rio Grande, em especial a Josencler, Isabel, Alessandra, Lucas, Bianca, Carmem e Juliana.

Ao professor Marcelo Tesser pela ajuda no decorrer do experimento.

A CAPES pelo suporte financeiro através da concessão de bolsa de estudos.

As pessoas que conheci na EMA: Viviana, Vivianne, Miguel, Tatiane, Diego, Plínio, Iuri, Leo, Mércia. As vigilantes da EMA: Fabiano, Nero, José e Lúcio. Em especial a Paula Maicá que por muitas vezes foi buscar-me na FURG tarde da noite, pelas conversas horas a fio, pelas gargalhadas por tantas besteiras faladas. A Marcy com quem morei por um tempo, e com quem construir uma amizade tão natural sem cobranças, com conselhos necessários e na transformação de um dia chato em um dia divertido. A Shay que por muitas vezes não me deixou desacreditar quando me decepcionei com algo ou alguém e que sempre esteve lá quando eu precisava dia após dia.

Aos meus amigos de sempre: Ivis, Thays, Camila, Gisa, Paulo Ronaldo, Gabriela, Lorena, Aline, Guto, Breno, Bruno, Lorena, Junior (JJ), Alexandre, Ana Júlia. Por serem grandes companheiros, por compreenderem minha ausência, incentivar e darem força para que eu possa alcançar meus objetivos. A eles agradeço este trabalho, por reconhecer suas importâncias na minha vida.

RESUMO

Os fatores abióticos são um dos principais problemas na aquicultura, pois a alteração destes pode resultar em baixo nível de crescimento ou induzir efeitos deletérios que podem eventualmente levar a morte dos organismos. Neste trabalho, fez-se uma simulação da variação de oxigênio dissolvido com desligamento da aeração até que os níveis nos tanques atingissem 3 mg/L (condição de hipóxia) quando então a aeração era religada. Com base nestas condições foi avaliado o aumento na competência antioxidante do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) como resultado da ação do ácido lipóico (AL) aplicado a ração, nas doses de 35, 70 e 140 mg de AL para cada 1 kg de ração, quando exposto a uma situação de hipóxia/re-oxigenação. Foram utilizados camarões machos e fêmeas com peso inicial de 2,07 g ($\pm 0,24$). A atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST) aumentou na dose de 70 mg de AL/kg nas brânquias, no entanto, no hepatopâncreas a resposta foi bifásica, as vezes aumentando e as vezes diminuindo. As análises dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) em brânquias constatou que o AL induziu um efeito fortemente antioxidante na dose de 70 mg/kg após 4 h de re-oxigenação. No hepatopâncreas o AL reduziu os níveis de TBARS após de 0,5 h de re-oxigenação na dose de 35 mg AL/kg, e logo após 4 h apresentou em efeito pró-oxidante. Na avaliação da capacidade antioxidante total contra peroxi-radicaís foi constatado que em normóxia as doses de 70 e 140 mg AL/kg induziram um efeito antioxidante nas brânquias do camarão. No hepatopâncreas, em normóxia, a dose de 70 mg AL/kg promoveu um efeito antioxidante, enquanto que no organismos submetidos a hipóxia/re-oxigenação foi constatado que a dose de 140 mg AL/kg promoveu um aumento da capacidade antioxidante. Ainda, nas duas doses mais altas de AL (70 e 140 mg/kg) foi verificado um aumento de peso dos camarões. Sugere-se que a dose mais indicada seja a de 70 mg de AL para 1 kg de ração, por apresentar melhores resultados nas análises bioquímicas e por induzir aumento de peso ao camarão os quais atingiram peso final de 7,94 g ($\pm 0,15$).

PALAVRAS CHAVE: *Litopenaeus vannamei*, ácido lipóico, hipóxia/re-oxigenação, glutathiona-S-transferase, peroxidação lipídica, capacidade antioxidante.

ABSTRACT

The abiotic factors are a major problem in aquaculture, because changing them can result in low growth or induce deleterious effects that may eventually lead to death of organisms. In this work, it was a simulation of the variation of dissolved oxygen by turning off the aeration tanks in which the levels reached 3 mg/L (hypoxic condition) when the aeration was then restarted. Under these conditions we evaluated the increase in antioxidant power of the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) as a result of action of lipoic acid (LA) applied to food at doses of 35, 70 and 140 mg of LA for each 1 kg ration when exposed to a hypoxia/re-oxygenation. We used juvenile male and female shrimps with initial weight of 2.07 g (\pm 0.24). The activity of glutathione-S-transferase (GST) increased in a dose of 70 mg AL/kg in the gills; however, in the hepatopancreas response was biphasic, sometimes increasing and sometimes decreasing. The analysis of the levels of lipid peroxidation (TBARS) in gills showed that LA induced a strong antioxidant effect at a dose of 70 mg/kg after 4 h of re-oxygenation. In the AL hepatopancreas decreased levels of TBARS after 0.5 h re-oxygenation in a dose of 35 mg AL/kg, and after 4 hours resulted in pro-oxidant effect. In assessing the total antioxidant capacity against peroxy-radicals was found that in normoxia the doses of 70 and 140 mg AL/kg induced an antioxidant effect in the gills of the shrimp. In the hepatopancreas, in normoxia, the dose of 70 mg AL/kg provided an antioxidant effect, whereas in organisms subjected to hypoxia/re-oxygenation was found that the dose of 140 mg AL/kg caused an increase in antioxidant capacity. Still, the two higher doses of LA (70 and 140 mg/kg) there was an increase in weight of shrimp. It is suggested that the optimal dose is 70 mg of the AL to 1 kg, by offering better results in biochemical analysis and to induce weight gain to shrimp which reached the final weight of 7.94 g (\pm 0, 15).

KEY WORDS: *Litopenaeus vannamei*, lipoic acid, hypoxia/re-oxygenation, glutathione S-transferase, lipid peroxidation, antioxidant capacity.

1 INTRODUÇÃO

Desde o momento em que a pesca vem a cada ano reduzindo o nível de captura em função das principais áreas de pesca já atingiram seu máximo potencial de extração, a aquicultura surgiu como uma alternativa de contribuir para o aumento da demanda por produtos aquáticos como resultado do crescimento da população mundial. Contudo, o grande desafio para a solidificação da atividade aquícola está em proporcionar aumento da produtividade de produtos marinhos, assim como proporcionar diversidade de espécies cultivadas além do importante desafio de simular um ambiente de cultivo bem próximo ao ambiente natural a qual a espécie alvo tinha por habitat (FAO 2008).

Nos últimos 50 anos a aquicultura mundial apresentou grande crescimento, comprovado pelo aumento de produção de 1 milhão de toneladas em 1950 à 51,7 milhões de toneladas em 2006 (FAO 2008). Em termos monetários, isso representa a movimentação de 70,3 bilhões de dólares do setor aquícola mundial. No entanto, há uma clara assimetria de produção uma vez que deste montante 69,6% foi gerado pela China (representando 51,5 milhões de toneladas – 78,1%, seguidos por outros setores asiáticos e da região do Pacífico com 21,9%. Depois vem Europa ocidental contribuindo com 3,5% (2,1 milhões de toneladas – 5,4 bilhões de dólares). Europa central e oriental aportam com 0,4% (250 mil toneladas) da produção e América Latina e Caribe com 2,3%. Seguem América do Norte com 1,3% e por fim Oriente médio com 0,9% e África com 0,2% (FAO 2006; FAO 2008). Em 2006, o crescimento anual da China foi de 19,4%, representando 89% em quantidade de produção (77% em valor). América Latina e Caribe obtiveram maior crescimento anual com 22%, seguidos por Oriente Médio 20% e África 12,7% (FAO 2008).

Acompanhando as exigências de mercado, cada região dá um maior enfoque as espécies de maior demanda. Para tanto, em termos globais, a maior produção são plantas aquáticas; seguidos de cultivo de ciprinídeos; ostras e peneídeos. As maiores produções de ostras vêm da região do Pacífico. Assim como as de salmonídeos da Europa Ocidental (principalmente do norte do continente) e carpas que lideram tanto em quantidade quanto em valor a produção no leste e região central da Europa. Na América do Norte domina a espécie bagre do canal (*Ictalurus punctatus*). No Canadá o salmão do Pacífico (gênero *Oncorhynchus*). Na América Latina e Caribe o cultivo de

salmonídeos ultrapassou ao de camarão devido à proliferação de doenças em grandes áreas de produção e o rápido crescimento da produção de salmão (*Salmo salar*) no Chile. Na região africana, a Nigéria destaca-se com produção de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e outros peixes de água doce (FAO 2006). Segundo dados mais recentes, a China continua sendo o maior produtor de pescado com 51,5 milhões de toneladas em 2006 (17,1 e 34,4 milhões provenientes da pesca de captura e aquicultura, respectivamente) (FAO 2008).

Efetuada uma discriminação da produção temos que China, Índia, Filipinas, Indonésia, Japão, Vietnã e Tailândia compõem as sete principais nações produtoras do mundo. Em 2004, a maricultura (cultivo de organismos marinhos) produziu 30,2 milhões de toneladas correspondendo a 50,9% do total global, tendo em moluscos e plantas aquáticas seus maiores produtos (42,9% e 45,9% respectivamente). A aquicultura de água doce contribui com 25,8 milhões de toneladas (43,5%), consistindo basicamente na produção de peixe. Cultivos em ambientes de água salobra com 3,4 milhões de toneladas (5,7%), sendo a maior parte composta por camarões peneídeos (63,1%) e peixes (34%), com destaque para “milkfish” (*Chanos chanos*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Egito (FAO 2006). Em 2006, comparando à taxa de crescimento anual aquícola a ordem dos principais países passou a ser China, Índia, Vietnã, Tailândia, Bangladesh, Chile, Japão, Noruega e Filipinas (excluindo os dados de produção de plantas aquáticas). A contribuição de crustáceos no abastecimento mundial tem crescido rapidamente na última década, com 42% da produção mundial (70% de camarões peneídeos) (FAO 2008).

Ainda quando as regras para exercer a atividade aquícola não estavam estabelecidas iniciou-se a introdução de espécies exóticas (animais ou vegetais que se fixam em locais onde não são naturalmente encontradas). A princípio a maior vantagem deste procedimento era a superioridade em termos de crescimento dessas espécies, *a posteriori* constatou-se que elas levavam vantagem também por apresentar taxa de conversão alimentar mais eficiente, serem resistentes a doenças e maior tolerância ao adensamento (FAO 2006).

Assim como no mundo, a aquicultura no Brasil está galgada na produção economicamente rentável, ambientalmente sustentável e socialmente aplicável. O

crescimento da aquicultura brasileira deve-se a estabilização de pescado, ao desenvolvimento tecnológico ao incrementar alimento como resultado do aumento populacional, introdução de novas espécies, utilização de outros ambientes, maior produtividade por área (IBAMA 2008).

O Brasil possui uma grande extensão territorial o que lhe permite obter grandes produções aquícolas tanto seja esta efetuada em água doce ou salgada. Além disso, entre as regiões norte e sul do país, existem diferenças características de clima, por esta favorável particularidade cada região oferece condições para que o Brasil ofereça uma variedade de espécies durante todo ano, a faixa litorânea brasileira corresponde a aproximadamente 8.500 Km, e o cultivo de organismos marinhos representam apenas 15% do que o Brasil captura na pesca extrativa (Diegues 2006). O estudo de Sanches *et al.* (2008) esclarece que a atividade vem ganhando impulso nos últimos anos devido aos bons resultados das pesquisas realizadas por universidades e instituições e por isso despertando interesse de empresas privadas.

Na década de 90, com intuito de desenvolver a carcinicultura brasileira em âmbito empresarial, a espécie *L. vannamei* foi introduzida no país por apresentar capacidade de adaptação a diferentes condições de cultivo, incluindo variações de parâmetros físico-químicos e boa taxa de reprodução em ambientes confinados (Holthuis 1980; Santos & Coelho 2002). Na atualidade, a cultivo de camarão é o segmento mais expressivo da maricultura no Brasil, tanto em termos de volume quanto em geração de renda, esta atividade teve seu momento mais significativo, em 2004, quando a produção mundial foi de 90.000 toneladas da espécie de *Litopenaeus vannamei* (FAO 2006). Em 2004 o volume de produção começou a declinar, devido a ação “anti-dumping” promovido pela “Southern Shrimp Alliance” e por enfermidades, em particular a infecção causada pelo vírus IMNV (vírus da mionecrose infecciosa) que se estendeu com rapidez por toda região nordeste, o maior polo produtor, outro fator não menos influente foi a ordem econômica, que no segundo semestre de 2003, registrou-se queda da moeda americana (dólar) em relação a moeda brasileira, com isso a renda proveniente de exportações foi menor, desacelerando a produção (FAO 2006).

Em 2007 a produção brasileira de camarão marinho chegou a ser estimada em 65 mil toneladas, com maior quantidade comercializada no mercado interno, apresentando

portando gradativo crescimento como resultado da modificação no sistema de produção com a mudança de cultivo extensivo para cultivo intensivo, somado ao uso de tecnologias de recirculação e bioflocos, minimizando assim impactos ambientais (Cavalli & Ferreira 2010).

Para que o crescimento da carcinicultura continue acelerado faz-se necessário um mecanismo que proporcione ao camarão maior resistência fisiológica a fatores ambientais e um dos fatores a ser pesquisa é o oxigênio dissolvido. A variação do oxigênio dissolvido em ambiente de cultivo naturalmente ocorre ao longo do dia, pela manhã há alta concentração de oxigênio dissolvido por meio da ação do fitoplâncton, durante a noite essa concentração reduz-se. A falta de oxigênio, com a posterior re-oxigenação é um fator de estresse que pode afetar a capacidade de manter a homeostasia e o metabolismo dos organismos em cultivo, comprometendo a taxa de crescimento, sobrevivência, e sistema imune de camarões peneídeos como *L. vannamei*. Deste modo, mudanças em algumas variáveis ambientais abióticas podem aumentar a vulnerabilidade do camarão a enfermidades por micro-organismos patógenos presentes no ambiente de cultivo (Zhou *et al.* 2009).

Em ambiente de cultivo quando ocorrem problemas com níveis de oxigênio dissolvido, procura-se solucionar o problema com uso de aeradores, sopradores, diluição de peróxido de hidrogênio na água, entre outros. Este tipo de procedimento pode ocasionar problemas aos organismos em cultivo e, eventualmente, reduzir sua resistência a enfermidades, pois nesta situação o organismo do camarão está em desequilíbrio entre espécies reativas e sua capacidade antioxidante, este desequilíbrio é chamado de estresse oxidativo (Pinheiro *et al.* 2007; Zenteno-Savín *et al.* 2006).

Os camarões, como qualquer organismo aeróbico, são susceptíveis ao estresse oxidativo, resultado da ação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem ser provenientes do meio ambiente (exógenas) ou gerada no próprio organismo (endógenas). Em uma situação de hipóxia/anóxia ocorre auto-degradação de ATP que através de uma reação em cadeia ocorre formação de hipoxantina, quando o ocorre re-oxigenação o oxigênio molecular age sobre a hipoxantina produzindo radical superóxido (O_2^-). Estas ERO agem sobre biomoléculas que compõem membranas celulares, proteínas, DNA e RNA, os efeitos negativos deste processo são combatidos ou

amenizados pela ação de antioxidantes adicionados a dieta (Barreiros *et al.* 2006) ou produzidos no próprio organismo. Em situação normal faz-se necessário o equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e o sistema de defesa antioxidante, tanto enzimático quanto não enzimático (Ferreira & Matsubara 1997).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas por diversos tipos de tecidos por meio de reações de redução do oxigênio molecular (O_2), havendo formação de múltiplos elementos intermediários tóxicos e reativos, como por exemplo: radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxil (HO^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Hermes-Lima 2004). Em seres aeróbicos, as principais fontes endógenas de produção de ERO são as mitocôndrias, por meio da cadeia de transportes de elétrons, células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos), reações de autooxidação e outras. Como fontes exógenas podem ser citadas drogas oxidantes (paracetamol, tetracloreto de carbono), fumo, radiação ionizante e luz solar (Ferreira 2000).

Com exceção do peróxido de hidrogênio que é uma espécie reativa de oxigênio, mas não é um radical livre, o radical superóxido e radicais hidroxil são radicais livres (RL) e, portanto, são espécies químicas possuidoras de um ou mais elétrons não emparelhados. Os RL têm a peculiaridade especial de serem altamente reativos. Uma vez formados, buscam estabilizar-se, cedendo ou capturando um elétron de espécies químicas vizinhas. Estas, por sua vez, viram RL e se estabilizam, tomando ou cedendo elétrons de outras substâncias. Cria-se uma reação em cadeia que termina por alterar a estrutura ou as funções de proteínas, fosfolipídios de membrana, ácidos nucleicos e outros componentes celulares. Em organismos aeróbicos são produzidos vastas quantidades de espécies reativas de oxigênio, responsáveis pelo envelhecimento fisiológico (Hermes-Lima 2004; Riegel 2004).

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é considerado um agente oxi-redutor, pela capacidade em receber e doar elétrons. Este pode atingir a célula diretamente em uma ação pró-inflamatória ou indiretamente por geração de outros radicais (H_2O_2 e HO^{\cdot}). Assim como ocorre também com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a formação direta deste composto se dá pela metabolização de ácidos graxos nos peroxissomas, fagocitose e outros processos celulares. Existem também formas indiretas de geração, como por exemplo, a partir da dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ por resultado da oxidação aeróbica de

substratos e ação da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD). Em concentrações fisiológicas, o radical H_2O_2 pode não ser tóxico as células, contudo a toxicidade torna-se evidente quando em contato com formas reduzidas de metais de transição (Fe^{+2} ou Cu^+), o que origina radical hidroxil ($HO\cdot$) que é altamente danoso aos tecidos (Hermes-Lima 2004).

O sistema de defesa contra ERO incluem processos enzimáticos e não-enzimáticos que se sucedem a nível celular (Otsuka 2004). Tão natural como à formação de ERO é a existência de substâncias capazes de neutralizar as ERO, esses varredores (“scavengers”) têm a propriedade de receber ou ceder elétron, interrompendo as reações de propagação. Nos organismos aeróbios existem enzimas antioxidantes como a superóxido demutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidases (GPx) (Bisbal *et al.* 2010)

As ERO como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$); radical hidroxila ($HO\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são produzidas no organismo em condições fisiológicas tanto normais quanto patológicas (Wajner *et al.* 2004). A necessidade de prevenir e/ou interceptar ERO, no decorrer da evolução, acarretou no desenvolvimento de defesas antioxidantes, comumente divididas em enzimáticas e não-enzimáticas. Dentre as defesas antioxidantes não-enzimáticas, o tripeptídeo glutatona (GSH) é considerado a primeira ação de defesa contra ERO (Anderson 1998; Dickinson & Forman 2002).

Os antioxidantes enzimáticos protegem os organismos quando proporciona a decomposição de radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou ainda a degradação de agentes pró-oxidantes menos reativos como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Antioxidantes não enzimáticos como o α -tocoferol, carotenóides e flavonóides, entre outros, interferem na ação das ERO ou regeneram danos causados a sistemas biológicos essenciais (Barreiros *et al.* 2006). Dentre os antioxidantes não-enzimáticos cabe também mencionar o ácido lipóico (AL), uma molécula com características hidro e lipossolúvel. Os múltiplos efeitos do ácido lipóico em tratamentos de diabetes, Alzheimer e hipertensão, por exemplo, mostra seu grande potencial em tratamentos de doenças humanas, além disto, em peixes como o pacu o ácido lipóico restaura os níveis de ácido ascórbico (Terjesen *et al.* 2004; Trattner *et al.* 2007).

O ácido lipóico e sua forma reduzida, o ácido dihidrolipóico, preenchem todos os critérios avaliados na análise do potencial antioxidante de um composto: quelam metais, são varredores de ERO, participam da reciclagem de outras moléculas antioxidantes e do reparo de moléculas danificadas pelo estresse oxidativo (Packer *et al.* 1995). O ácido lipóico a princípio foi classificado como vitamina, contudo posteriormente foi constatado que este composto é sintetizado em células animais (Carreau 1979), atuando como co-fator em complexos multi-enzimáticos que catalisam reações de descarboxilação oxidativa no ciclo de Krebs (Packer *et al.* 1995). Nas últimas décadas o ácido lipóico tem recebido atenção devido a sua função antioxidante, além de indicar benefícios em usos terapêuticos, como mencionado anteriormente (Biewenga & Haenen 1997).

Assim como ocorre em processos fisiológicos de isquemia seguida de re-perfusão (Halliwell & Gutteridge 2007), situações de anóxia/hipóxia seguida de re-oxigenação podem ser deletérias para organismos aquáticos. O trabalho de Zenteno-Savín *et al.* (2006) mostra que hipóxia seguida de re-oxigenação aumenta os níveis do ânion superóxido (O_2^-) no músculo e no hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei*. O próprio sistema imune de crustáceos através da atividade da profenoloxidase (Söderhäll & Cerenius 1998) é fonte geradora de espécies reativas de oxigênio, existindo uma correlação entre a atividade desta enzima e os níveis circulantes de carotenóides no crustáceo *Gammarus pulex* (Cornet *et al.* 2007).

O papel do ácido lipóico no re-estabelecimento dos níveis de ácido ascórbico no pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é importante desde o ponto de vista bioquímico e fisiológico. O pacu, assim como outros teleósteos, não sintetiza o ácido ascórbico, sendo este, portanto, uma vitamina. Sua deficiência induz uma redução de crescimento e maior suscetibilidade a vários tipos de doenças. Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e carpas (*Cyprinus carpio*) a deficiência de vitamina C provoca anorexia, lordose, escoliose, hemorragias, deformações em brânquias, exoftalmia (Trattner *et al.* 2007).

No entanto, ainda não há até o momento bibliografia que analise o efeito do ácido lipóico em crustáceos, o que certamente indica a necessidade de gerar informação a respeito. Contudo, trabalhos realizados com suplementação de α -tocoferol no

caranguejo *Neohelice granulata* mostraram que este antioxidante modula a resposta em termos da atividade da glutathione-S-transferase branquial em organismos confrontados com a cianotoxina microcistina (Pinho *et al.* 2005). No trabalho de Monserrat *et al.* (2008), é mostrado que há redução de proteínas oxidadas em músculo e fígado do peixe *Corydoras paleatus* que tinham sido alimentados com ração suplementada com ácido lipóico. Desta forma, pode-se pelo menos inferir a utilidade potencial da utilização de rações enriquecidas com antioxidantes em atividades de carcinicultura.

O camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* é uma espécie muito cultivada e que apresenta ampla tolerância à salinidade. Li *et al.* (2008) mostraram que em baixas salinidades ocorre indução da atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Deste modo considera-se possível a utilização de rações enriquecidas com antioxidantes para assim confrontar eventuais variáveis de fatores abióticos. O estudo de Mohankumar & Ramasamy (2006) mostra que há redução significativa na atividade enzimática antioxidante em presença do vírus da mancha branca (“white spot”), sendo que estes autores observaram diminuição da atividade enzimática com a progressão da infecção, indicando assim um aumento do nível de estresse oxidativo numa doença frequente em camarões cultivados.

O camarão *L. vannamei* é a espécie de maior interesse econômico nos últimos anos no mundo, por isso muitos trabalhos são executados com o intuito de proporcionar condições próximas ao ideal para o crescimento da espécie em ambiente de cultivo. Entre os problemas que acontecem na cultivo de organismos aquáticos, inclui-se a variação do oxigênio dissolvido ao longo do dia ou ainda por falhas mecânicas nos sistemas de oxigenação, assim, a diminuição (hipóxia) ou a falta de oxigênio (anóxia) é um fator de estresse que pode alterar o balanço entre níveis de pró-oxidantes e antioxidantes, com potencialidade de induzir efeitos deletérios nos organismos (Pinheiro *et al.* 2007; Zenteno-Savín *et al.* 2006). Além disso, variações nas concentrações de oxigênio dissolvido são muito expressivas ao longo das atividades de cultivo. Nos períodos diurnos as concentrações de oxigênio dissolvido são elevadas devido a atividade fotossintética do fitoplâncton presente nos viveiros de cultivo, alcançando níveis acima de 5 mg/L. Entretanto, nos períodos noturnos e principalmente antes do amanhecer as concentrações podem ser muito baixas, muitas vezes alcançando

concentrações sub-letais que podem afetar o crescimento dos camarões, e ainda com menor frequência concentrações muito baixas (menos que 1 mg/L) que podem causar mortalidades massivas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Submeter o camarão branco *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae), a uma ração enriquecida com ácido lipóico e verificar seu efeito em termos de modulação do sistema antioxidante e aumento da capacidade de resistência frente a uma situação de hipóxia/re-oxigenação súbita, em brânquias e hepatopâncreas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

– Avaliar a resposta do hepatopâncreas e brânquias de *L. vannamei* após submeter o camarão a uma condição de hipóxia/re-oxigenação súbita, analisando o papel do ácido lipóico em modular respostas:

- Da atividade da enzima glutationala-S-transferase;
- Da capacidade antioxidante total;
- Estresse oxidativo (peroxidação lipídica).

– Avaliar o efeito da suplementação com ácido lipóico na ração de *L. vannamei* na variação de crescimento.

3 HIPÓTESES

–O ácido lipóico influencia nos níveis de parâmetros bioquímicos e crescimento?

–Hipóxia e re-oxigenação influenciam nos níveis de parâmetros bioquímicos?

–O ácido lipóico minimiza ou anula os efeitos da hipóxia/re-oxigenação do ponto de vista bioquímico?

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os camarões utilizados foram da espécie *Litopenaeus vannamei* (Fig. 1), machos e fêmeas juvenis, provenientes do setor de larvicultura da Estação Marinha de Aquicultura (EMA), Universidade Federal do Rio Grande – FURG, que após 30 dias foram retirados e transferidos para viveiros berçários. O experimento foi realizado durante 45 dias, nos meses de fevereiro e março de 2010, na sala experimental da EMA. Os organismos permaneceram a temperatura ambiente (ou água) (32° C), em água salgada com salinidade de 32 e com aeração em acima de 5 mg/l, com pH entre 6 e 9.



Figura 1 – Exemplos de *Litopenaeus vannamei* utilizados nos ensaios.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

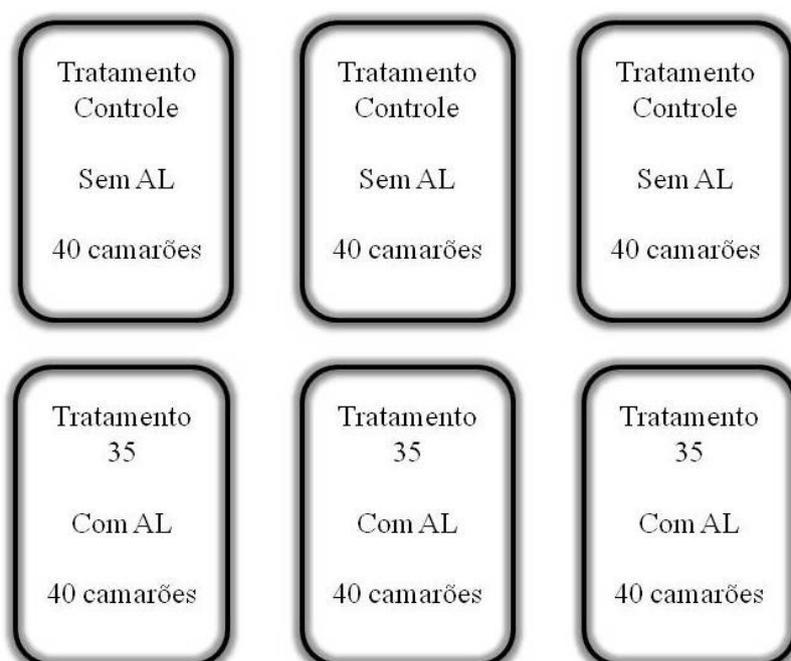
Foram utilizados 16 tanques plásticos de 50 L cada, com renovação entre 20% - 40% de água. Os camarões ($2,07 \text{ g} \pm 0,24$) foram estocados na densidade de 40 camarões por tanque (aproximadamente 200 camarões por m^2) distribuídos em:

- Tratamento controle, sem adição de ácido lipóico na ração,
- Tratamento 35 com AL, na proporção de 35 mg de ácido lipóico (AL) por 1 kg de ração,

- Tratamento 70 com AL, na proporção de 70 mg de ácido lipóico (AL) por 1 kg de ração,
- Tratamento 140 com AL, na proporção de 140 mg de ácido lipóico (AL) por 1 kg de ração.

Cabe mencionar que as doses selecionadas foram feitas com base em ensaios semelhantes realizados com peixes (Monserrat *et al.* 2008). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata (Fig. 2a e 2b).

A ração utilizada foi à ração comercial PurinaR[®] contendo 45% de proteína bruta (11% de umidade; 13% de cinzas; 0,1% de fibras; 6% de lipídios; 0,1 mg/kg de fósforo; 0,01 mg/kg de cálcio; 0,09 kcal/kg de energia) fornecida três vezes ao dia (8; 15 e 22 h) a 3% do valor da biomassa do camarão. O ácido lipóico foi misturado à ração e água destilada (Fig. 3 e 4), depois seco a 50°C para obtenção dos pellets (Fig. 5) (Monserrat *et al.* 2008). A ração do grupo controle passou pelo mesmo processo, porém sem adição de ácido lipóico.



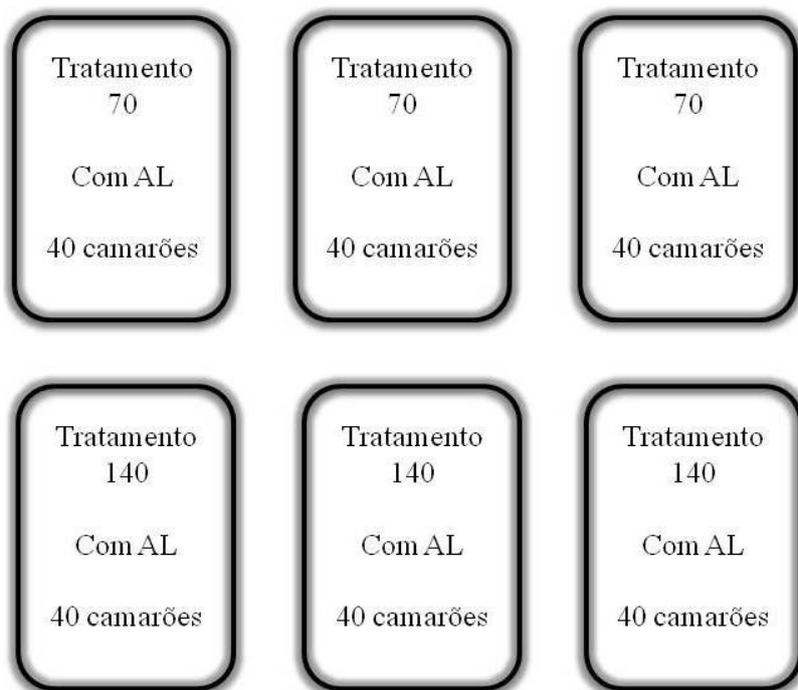


Figura 2a – Desenho experimental.



Figura 2b – Desenho experimental.



Figura 3 – Material para preparo da ração e ração com ácido lipóico.



Figura 4 – Mistura de ração, ácido lipóico e água destilada.



Figura 5 – Ração seca em estufa a 50°C.

4.3 ANÁLISE DA ÁGUA

Foram medidos diariamente os parâmetros físicos e químicos da água, incluindo oxigênio dissolvido (mg/l), temperatura da água (°C), salinidade e pH através do medidor multiparâmetro YSI (Fig. 6).



Figura 6 – Multiparâmetro YSI.

4.4 METODOLOGIA PARA INDUZIR HIPÓXIA

Após 45 dias, os camarões foram submetidos à hipóxia. Uma semana antes deste processo, foram destinados dois tanques para o estado de normóxia e dois tanques em estado de hipóxia para cada dose de ácido lipóico analisada (Fig. 7). Os tanques em estado de normóxia permaneceram em constante aeração. Nos tanques em estado de hipóxia a aeração foi desligada até que o oxigênio dissolvido atingissem 3 mg/l, situação em que ainda não há morte do animal (Zenteno-Savin *et al.* 2006), e então religou-se a aeração. Após isso os camarões foram sacrificados em intervalos de 0,5, 1 e 4 h, para análise das respostas bioquímicas. Primeiramente, os camarões foram imersos em água e gelo, até atingir o estado de letargia foram imersos em nitrogênio líquido para matá-los.

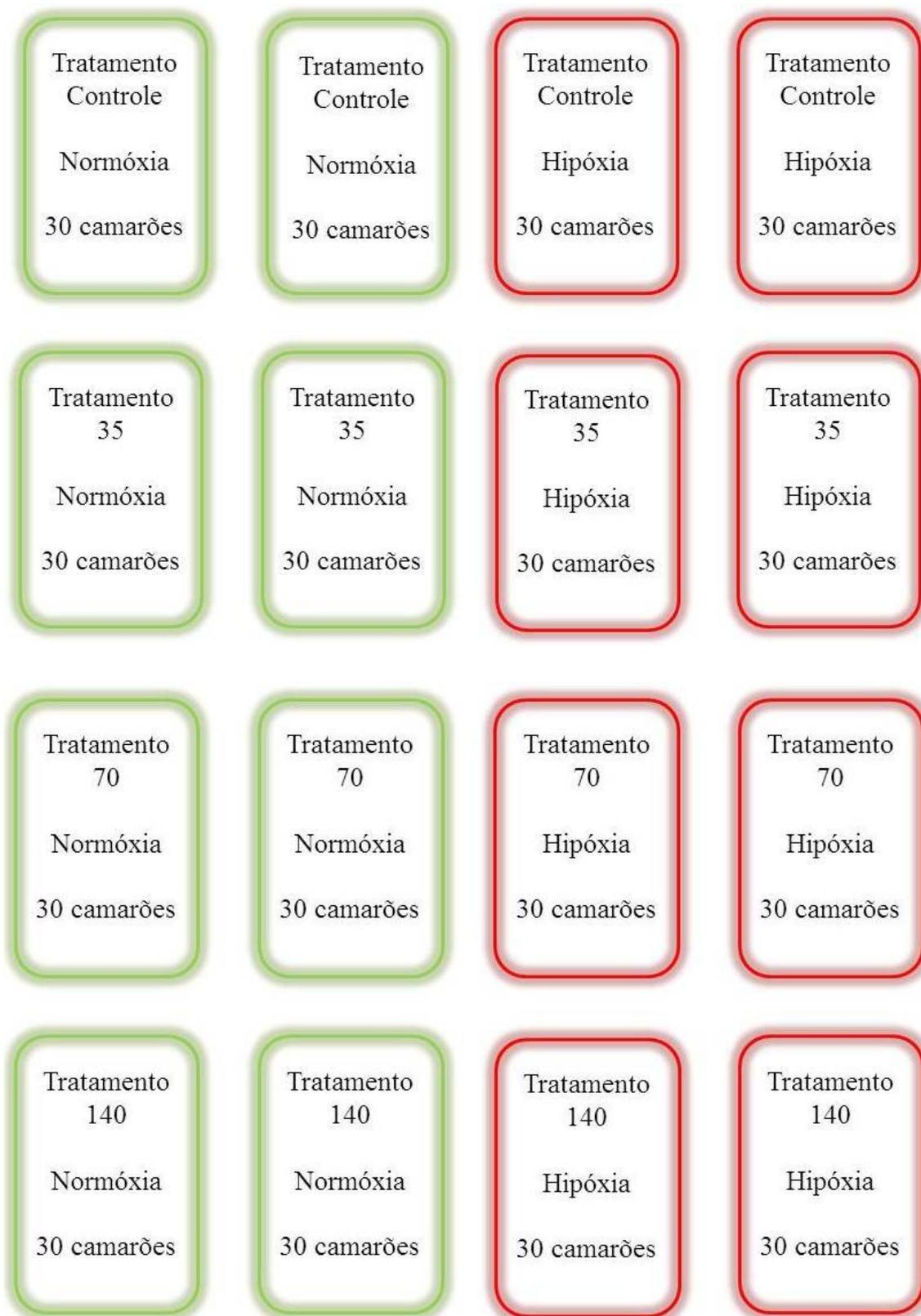


Figura 7 – Distribuição dos grupos experimentais em normóxia e hipóxia.

4.5 DISSECAÇÃO DOS CAMARÕES

Depois de imersos no nitrogênio líquido os camarões foram colocados no freezer para no dia seguinte efetuar o processo de dissecação, sendo retirado as brânquias (Fig. 8 e 9) e hepatopâncreas (Fig. 10). As amostras foram então envolvidas em papel alumínio devidamente etiquetadas (Fig. 11) e armazenadas em nitrogênio líquido (Fig. 12).



Figura 8 – Brânquia.



Figura 9 – Retirada da brânquia.



Figura 10 – Hepatopâncreas.



Figura 11 – Papel alumínio etiquetados e amostras de brânquias e hepatopâncrea.



Figura 12 – Balão de nitrogênio líquido.

4.6 HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram homogeneizadas com tampão de homogeneização de crustáceos para dosagens de enzimas antioxidantes composta por Tris, EDTA, DTT, sacarose, KCl e dissolvidos em água MilliQ, pH 7,2. O Tris é um composto orgânico com fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, conhecido como tris(hidroximetil)aminometano, e utilizado como substância tamponante. O EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) é um composto orgânico que age como agente quelante, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos, entre eles magnésio e cálcio, em valores de pH acima de 7, como é o caso do tampão utilizado neste trabalho. Este composto inibe assim a ação de proteases cálcio dependentes. DTT, ditioneitol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$), é um agente redutor que quebra pontes dissulfureto, entre aminoácidos como cisteína e metionina, reduzindo esta ligação (Figueiredo, 2010). A sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) tem a capacidade de precipitar proteínas e manter as condições ótimas de pH. Cloreto de potássio (KCl) é utilizado para promover o equilíbrio ácido-base na solução. As amostras foram pesadas (Fig. 13), então utilizadas à proporção de 1:5; ou seja, o peso da amostra vezes 5 que então fornecia o volume de tampão a ser adicionado. Depois de homogeneizado (Fig. 14) e centrifugado, com força centrífuga de 9000 x g, durante 30 minutos, em temperatura de 4°C (Fig. 15), foi retirado o sobrenadante que era dividido em três alíquotas para posterior análise de glutathione-S-transferase (GST), TBARS (avalia a peroxidação lipídica), e capacidade antioxidante (ACAP).



Figura 13 – Pesagem das amostras.



Figura 14 – Homoneização das amostras.



Figura 15 – Centrífuga.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

A enzima GST catalisa reações de conjugação de grande variedade de xenobióticos com o tripeptídeo glutationa (GSH), em um processo que ajuda na detoxificação celular. Sendo assim, a análise de enzimas é indicada para estudos das condições de saúde dos animais (Huber *et al.* 2008).

Os reagentes utilizados para análise se GST foram: tampão de reação (ou tampão fosfato), composto de fosfato de potássio (0,1 M) preparado a partir de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), dissolvido em água MilliQ e pH fixado em 7,0, CNDB (1-cloro-2,4 di-nitrobenzeno dissolvido em etanol 100% e a Glutationa reduzida (GSH) dissolvido em tampão fosfato. Em tubo Falcon de 15 ml coloca-se 3,8 ml de tampão de reação, que serão incubados e banharia a 25°C (no mínimo 15 minutos antes da montagem da placa). Inicia-se, então a montagem da placa (Fig. 16), com a aplicação de $15\ \mu\text{L}$ de amostra em triplicata nos poços, nos brancos acrescenta-se tampão de reação que se faz em duplicata em microplaca transparente. Coloca-se $80\ \mu\text{L}$ de CNDB no tudo Falcon que está em banharia, retirando-se $235\ \mu\text{L}$ desta mistura (tampão + CNDB) e colocando em cada poça. Por fim adiciona-se $10\ \mu\text{L}$ de GSH nas poças com pipeta de repetição. Finalmente são feitas as leituras em espectrofluorímetro com leitora de placas (Víctor 2, Perkin Elmer; Fig. 17).



Figura 16 – Montagem da placa.

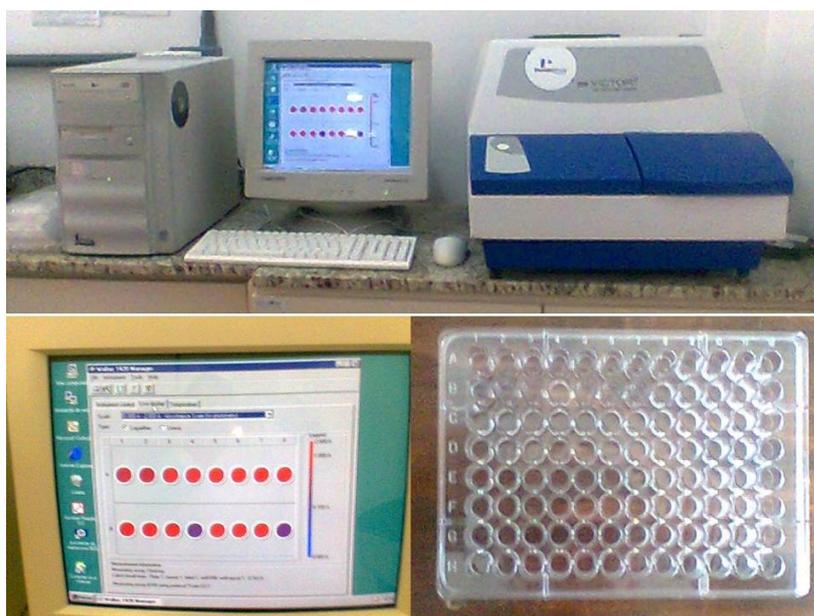


Figura 17 – Espectrofluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer).

4.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para determinação de dano oxidativo lipídico, a peroxidação de lipídios foi determinada pelo método TBARS de acordo com Oakes & Van der Kraak (2003). Este método envolve a reação do malondialdeído (MDA), um produto de degradação de lipídios peroxidados, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob condições de alta temperatura e acidez, gerando um cromógeno que é quantificado por fluorometria.

Os reagentes utilizados foram solução estoque de hidroxitoluenobutilado (BHT) na proporção de 15,5 mg de BHT para 50 ml de etanol. Usou-se também uma solução de ácido acético a 20% e ajustado o pH a 3,5 e uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,8%, ou seja, 0,4 g de TBA em 50 mL de água Milli Q. Esta solução sempre era preparada no momento de efetuar a dosagem, aquecendo a água para facilitar a dissolução e utilizando a solução posteriormente a temperatura ambiente. Foi também preparada uma solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) 8,1% (4,05 g de SDS para 50 ml de água destilada), que na dosagem de TBARS o SDS é um detergente que facilita a extração de malondialdeído.

No método TBARS por fluorometria é determinada a fluorescência das amostras e da curva padrão. A curva padrão é construída através de uma diluição seriada, onde primeiramente adiciona-se 5 μL de 1,1,3,3-tetramethoxypropano (TMP) a 25 ml de água Milli Q. Por diluição eram obtidas logo soluções contendo 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78; 0,39; 0,195; 0,0975; 0,04887; 0,0243 e 0,0121 nmol de TMP (Fig.18).

Em seguida, adiciona-se 10 μL de amostra e 41,2 μL de cada padrão em tubos de vidro (em duplicata). Adiciona-se 20 μL de solução estoque de BHT, apenas em tubos referentes às amostras. Adiciona-se a seguir 150 μL da solução de ácido acético 20% e logo 150 μL da solução de TBA 0,8%. Posteriormente, foram adicionados 50 μL de água Milli Q e logo 20 μL de SDS 8,1%. Após misturar em vórtex, os tubos eram aquecidos em banho-maria a 95 °C por 30 minutos (Fig.19). Logo os tubos eram esfriados por 10 minutos a temperatura ambiente. Depois disso, em capela, eram adicionados 100 μL de água Milli Q em cada tubo e a seguir 500 μL de n-butanol. Após misturar em vórtex, depois centrifugados 3.000 x g por 10 minutos a 15°C, para promover a separação da fase aquosa da alcoólica. A seguir eram removidos 150 μL da fase orgânica (sobrenadante), sendo adicionada em microplacas brancas para fluorescência (Fig. 20). Finalmente procedia-se a fazer a leitura em fluorímetro, com comprimento de excitação de 520 nm e emissão de 580 nm (Víctor 2, Perkin Elmer) (Fig. 21). Os resultados foram expressos em nmol de equivalentes de TMP por mg de tecido fresco.

O malondialdeído (MDA) é, portanto um produto da peroxidação lipídica, sendo utilizado como indicador de radical livre nos tecidos e possui ação citotóxica e genotóxica. Deste modo, a quantificação de MDA nos tecidos torna-se importante como parâmetro de avaliação do estresse oxidativo na célula. Então o princípio deste método quantifica a soma de diferentes substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, denominado TBARS. Logo, a quantificação de MDA é utilizada como marcador do dano oxidativo em moléculas lipídicas (Hermes-Lima 2004).



Figura 18 – Diluição seriada para formação da curva padrão.



Figura 19 – Aquecimentos dos tubos e banho-maria.



Figura 20 – Remoção 150 μ L da fase orgânica e adição a microplacas brancas para fluorescência.



Figura 21 – Leitura em fluorímetro.

4.9 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Avalia-se capacidade antioxidante total contra peroxi-radicaís através da determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em amostras de tecido. Esta metodologia seguiu o protocolo de Amado *et al.* (2009). Os reagentes utilizados foram tampão de reação, composto por 0,3575 g de ácido etanosulfônico 4.2-hidroxietil piperazina-1 (HEPES), 0,7455 g de cloreto de potássio (KCl), 0,0102 g de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) dissolvidos em 50 ml de água Milli Q com pH ajustado em 7,2. Ao momento da dosagem foi preparada uma solução estoque de 2,7 diclorofluoresceína (H_2DCFDA), dissolvendo 0,5 mg de H_2DCFDA dissolvido 4,275 ml de etanol 100%. Foi preparada também uma solução de 2,2- azobis2metilpropianoamidinadihidrocloro (ABAP), dissolvendo 0,0271 g de ABAP para 2,5 ml de água MilliQ. Antes do ensaio ajusta-se a concentração de proteína na quantidade adequada para o tipo de tecido analisado, sendo que neste trabalho a quantidade de proteína foi fixada em 2 mg/ml. Para o ensaio, em cada poça adiciona-se 127,5 μL de tampão de reação, 10 μL de extrato de tecido, 7,5 μL de água MilliQ para as amostras sem ABAP ou 7,5 μL de solução de ABAP, por este ser um gerador de radicais peroxil. Imediatamente antes de

iniciada as leituras de fluorescência eram colocadas 10 µL de solução de H₂DCFDA. A seguir era efetuada uma leitura imediata (leitura tempo zero) e logo a cada 5 minutos até completar 30 minutos em fluorímetro de placas (Victor 2, Perkin Elmer; Fig. 22). As leituras foram realizadas a 37 °C para promover a geração de peroxi-radicais através da termólise do ABAP.

Para a determinação de ERO o H₂DCFDA é utilizado por que na presença de ERO gera-se um fluorocromo que será detectado utilizando comprimento de ondas 488 nm para excitação e emissão, respectivamente. Portanto, este método quantifica a capacidade que o tecido possui em neutralizar as ERO, podendo ser defesas antioxidantes enzimáticas e/ou não enzimáticas.

O cálculo da capacidade antioxidante é feito através do cálculo da área relativa de com acordo com a fórmula:

$$\text{Área Relativa} = \frac{(\text{Área com ABAP} - \text{Área sem ABAP})}{\text{Área sem ABAP}}$$

Área sem ABAP

A área relativa significa a capacidade antioxidante, onde menores valores da área relativa indicam uma maior capacidade antioxidante.

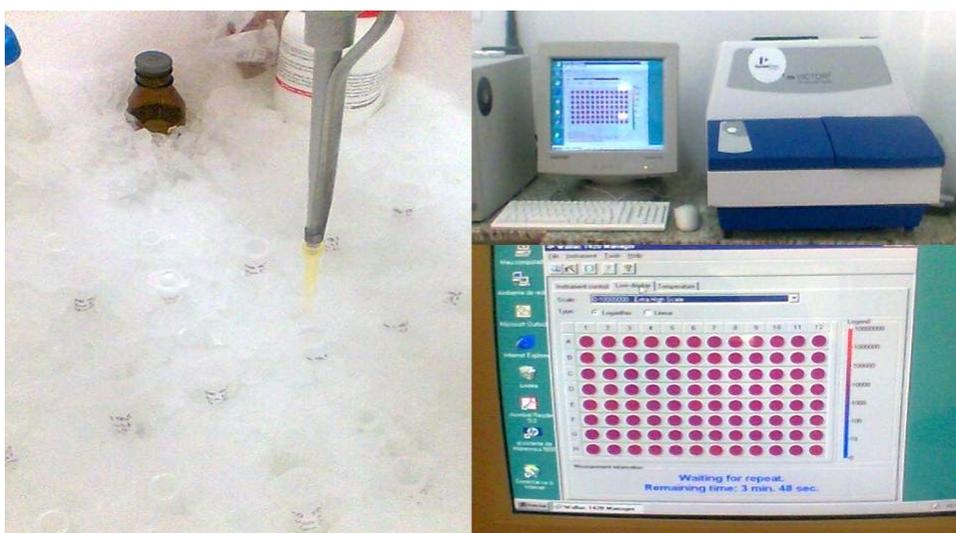


Figura 22 – Leitura em fluorímetro a cada 5 minutos por 30 minutos.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados obtidos para cada órgão (hepatopâncreas e brânquias) e cada tempo de re-oxigenação foram comparados pelo teste de ANOVA de dois fatores, sendo os fatores a concentração de ácido lipóico e a situação experimental (normóxia ou hipóxia/re-oxigenação). Em todos os casos foi utilizado um nível de significância de 5%. Previamente os pré-supostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram analisados. Comparações *a posteriori* foram realizadas utilizando o teste de Newman-Keuls ou contrastes ortogonais.

5 RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA

O pH médio foi de $7,77 \pm 0,02$, a salinidade média foi de $29,72 \pm 0,04$, a temperatura média foi de $27,71 \pm 0,04$ e a concentração média de oxigênio dissolvido foi de $6,52 \text{ mg/L } (\pm 0,17)$.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

5.2.1 Brânquias

Em brânquias, após a re-oxigenação no tempo de 0,5 h, o tratamento que apresentou maior atividade da GST foi o tratamento 70 (70 mg de AL para 1 kg de ração) apresentando diferença significativa com o controle ($p < 0,05$) na situação de normóxia. No entanto, na condição de hipóxia/re-oxigenação não foi observada resposta induzida pelo AL (Fig. 23A).

Para o tempo de 1 h, houve aumento substancial da atividade da GST ($p < 0,05$) em todos os tratamentos (35, 70 e 140 mg de AL para 1 kg de ração) quando comparada as atividade no tempo de 0,5h (Fig. 23B). Na condição de normóxia, o tratamento 35 (35 mg de AL para 1 kg de ração) induziu maior atividade da GST comparada ao grupo controle. No grupo que sofreu hipóxia/re-oxigenação os tratamentos 35 e 70 foram os que induziram maior atividade da GST quando comparada ao grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 23B).

No tempo de 4 h, foi constatado aumento ($p < 0,05$) na atividade da GST apenas para o tratamento 140 dentre os organismos que receberam areação constante (normóxia). Na situação de hipóxia/re-oxigenação não houve diferença significativa entre dos tratamentos comparados ao grupo controle ($p > 0,05$; Fig. 23C).

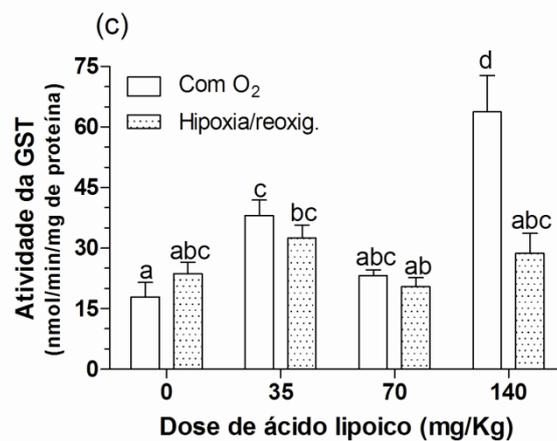
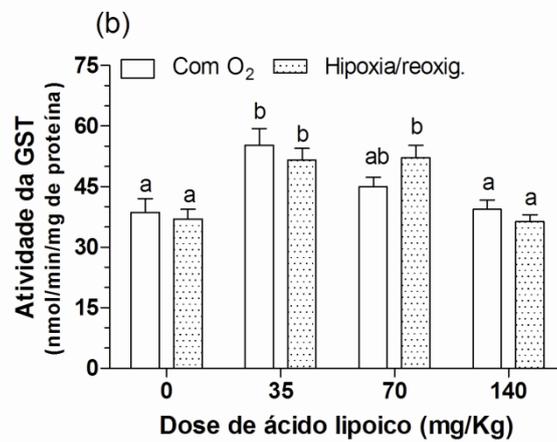
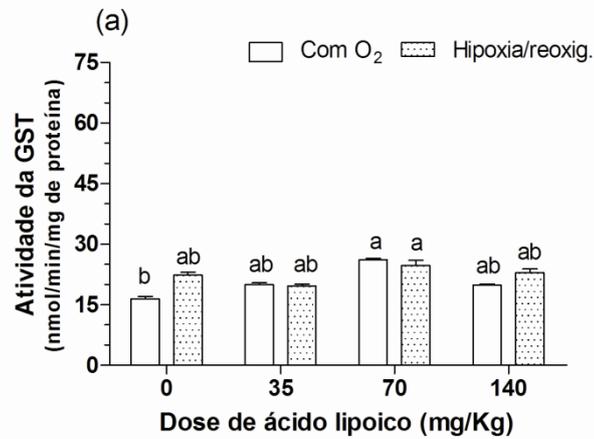


Figura 23 – Atividade da glutatona-S-transferase (GST) nas brânquias de *L. vannamei* em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140 mg por 1 kg de ração) após (A) 0,5 h; (B) 1 h; e (C) 4 h de re-oxigenação.

5.2.2 Hepatopâncreas

No hepatopâncreas, no tempo de 0,5 h não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos submetidos a diferentes doses de AL na condição normóxia. Na condição hipóxia/re-oxigenação o AL não causou alteração na atividade da GST (Fig. 24A).

Para o tempo de 1 h, verificou-se ausência de efeito do AL na condição normóxica ($p>0,05$; Fig. 24A). Na situação de hipóxia/re-oxigenação foi apenas constatada uma queda da atividade da GST na dose de 70 e 140mg AL/kg ($p<0,05$; (Fig. 24B).

Para o tempo de 4 h, nos grupos com aeração constante apenas o tratamento 140 foi que obteve a mesma atividade do grupo controle ($p>0,05$; Fig. 24C). Nos tratamentos 35 e 70 mg de AL/kg de ração foi observada menor atividade da GST ($p<0,05$; Fig. 24C). Na situação de hipóxia/re-oxigenação não foi alterada a atividade da GST comparada ao grupo com oxigênio constante ($p>0,05$). No entanto, nesta condição o tratamento 70 teve menor atividade com relação ao grupo controle ($p<0,05$; Fig. 24C).

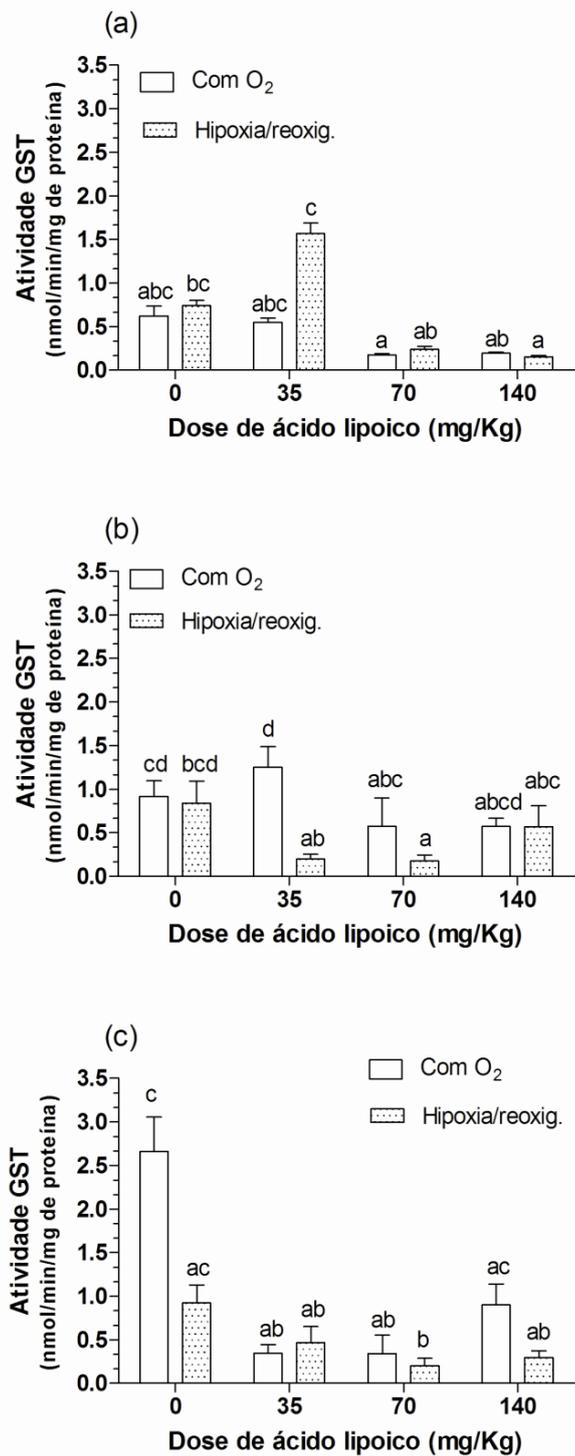


Figura 24 – Atividade da glutationa-S-transferase (GST) em hepatopâncreas de *L. vannamei* em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140 mg por 1 kg de ração) após: **(A)** 0,5 h; **(B)** 1 h; e **(C)** 4 h após re-oxigenação.

5.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

5.3.1 Brânquias

Tanto na situação normóxica quanto na de hipóxia/re-oxigenação não foram constatadas influências do tratamento com as diferentes doses de AL para o tempo de 0,5 h ($p>0,05$; Fig. 25A). No entanto, entre estas duas condições (normóxica e hipóxia/re-oxigenação), por contrastes ortogonais na dose de 140 mg AL/kg observou-se que a ação de hipóxia/re-oxigenação causou um aumento na peroxidação lipídica nas brânquias do camarão ($p<0,05$) (Fig. 25A).

Para o tempo de 1 h na situação de normóxica foi constatada na dose de 140 mg AL/kg um aumento da [MDA], verificando-se um efeito pró-oxidante do ácido lipóico ($p>0,05$; Fig. 25B). Nenhuma diferença estatística entre as diferentes doses de AL foi verificada na situação de hipóxia/re-oxigenação ($p>0,05$; Fig. 25B).

No tempo de 4 h, na situação normóxica, a principal diferença foi observada no tratamento 70 (70 mg de AL para 1 kg de ração), no qual observa-se uma redução da [MDA] quando comparado ao controle ($p<0,05$; Fig. 25C). Na situação hipóxia/re-oxigenação foi verificado um resultado semelhante ($p<0,05$; Fig. 25C).

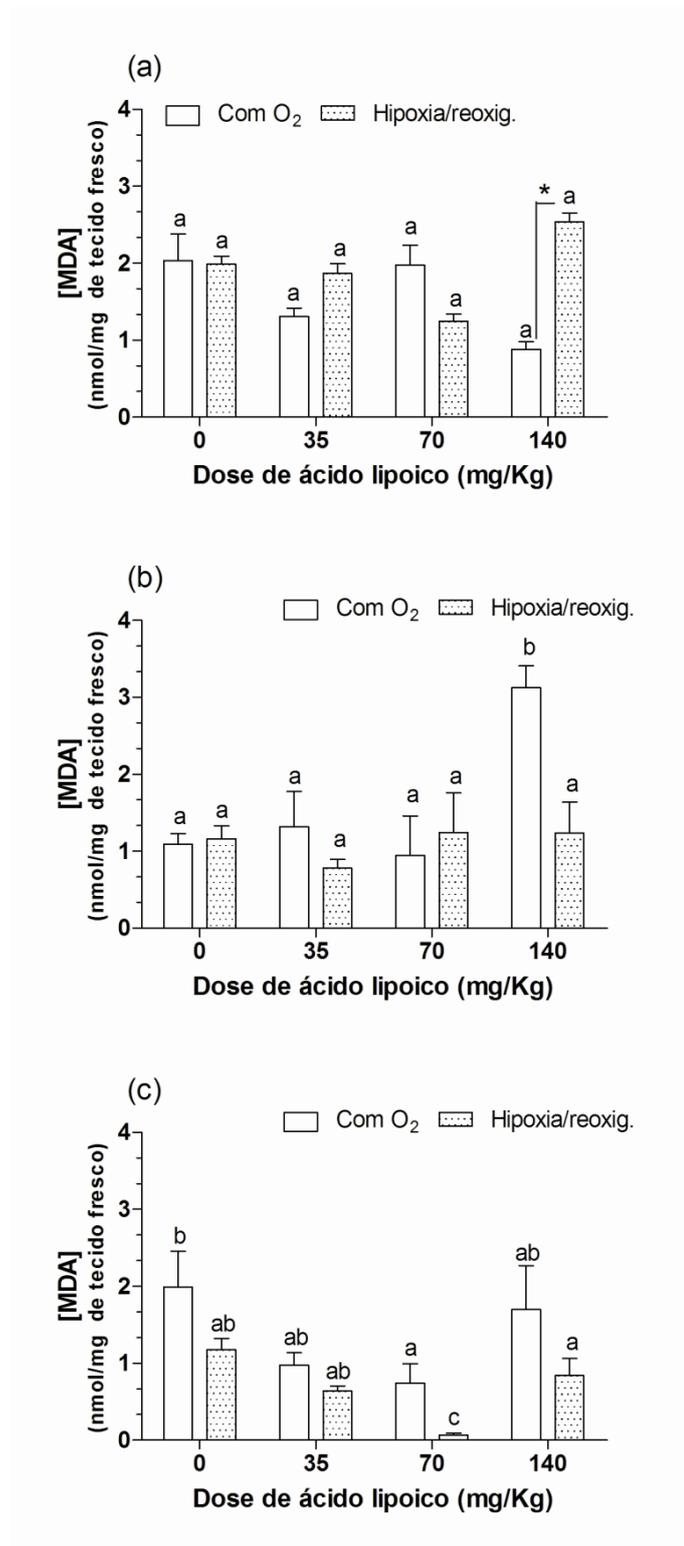


Figura 25 – Quantificação da concentração de MDA nas brânquias de *L. vannamei* em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140 mg por 1 kg de ração) após : (A) 0,5 h; (B) 1 h; e (C) 4 h de re-oxigenação.

5.3.2 Hepatopâncreas

Para o tempo de 0,5 h, na situação normóxica, não foi verificado um efeito do tratamento com AL na [MDA] ($p>0,05$; Fig. 26A). Na situação de hipóxia/re-oxigenação, o ácido lipóico, na dose de 35 mg/kg atuou como antioxidante, evidenciado pela queda da [MDA] ($p<0,05$; Fig. 26A).

Em 1 h, na situação normóxica, os tratamentos 35 e 140 mg AL/kg tiveram um efeito pró-oxidante ($p<0,05$; Fig. 26B). Na situação de hipóxia/re-oxigenação, o tratamento com ácido lipóico não alterou os níveis de peroxidação lipídica ($p>0,05$; Fig. 26B).

Em 4h, não foi observado um efeito do ácido lipóico na situação normóxica ($p>0,05$; Fig. 26C), enquanto que na condição hipóxia/re-oxigenação na dose de 35 mg/kg foi observado um efeito pró-oxidante do AL ($p<0,05$; Fig. 26C).

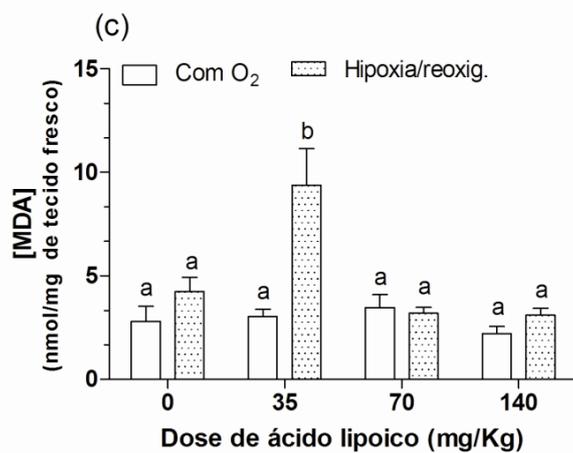
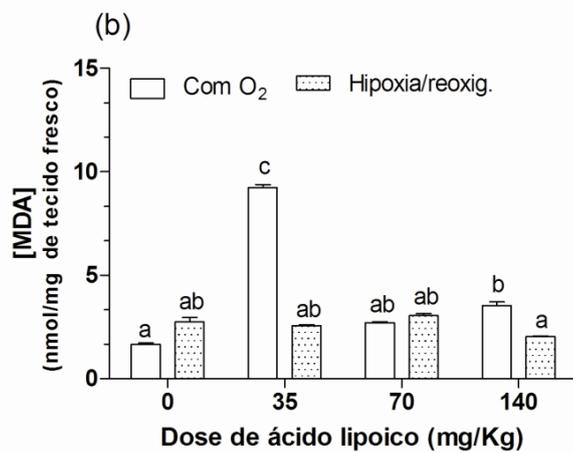
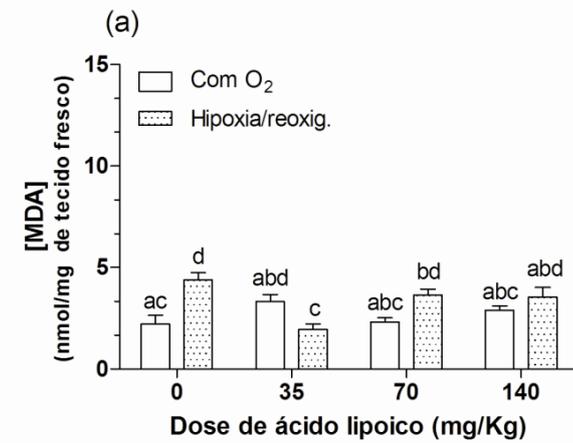


Figura 26 – Quantificação da concentração de MDA em hepatopâncreas de *L. vannamei* em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140 mg por 1 kg de ração) após : (A) 0,5 h; (B) 1 h; e (C) 4 h de re-oxigenação.

5.4 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

5.4.1 Brânquia

Na situação normóxica, após 0,5h, o tratamento 70 mg AL/kg aumentou a capacidade antioxidante quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 27A). Na condição hipóxia/re-oxigenação não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$; Fig. 27A).

Em 1 h, na condição normóxica, novamente o tratamento 140 mg AL/kg foi quem apresentou aumento da capacidade antioxidante, apresentando diferença significativa com o grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 27B). Para a condição hipóxia/re-oxigenação não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos ($p > 0,05$; Fig. 27B).

Em 4 h, na condição normóxica, as doses de 35 e 70 mg/kg de AL induziram uma queda na capacidade antioxidante total em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 27C). Na situação de hipóxia/re-oxigenação a perda da capacidade antioxidante total foi registrada apenas na dose de 35 mg AL/kg ($p < 0,05$; Fig. 27C). Foi também observado, no grupo controle, que a condição de hipóxia/re-oxigenação levou a uma perda da capacidade antioxidante total quando comparada com a condição normóxica ($p < 0,05$; Fig. 27C).

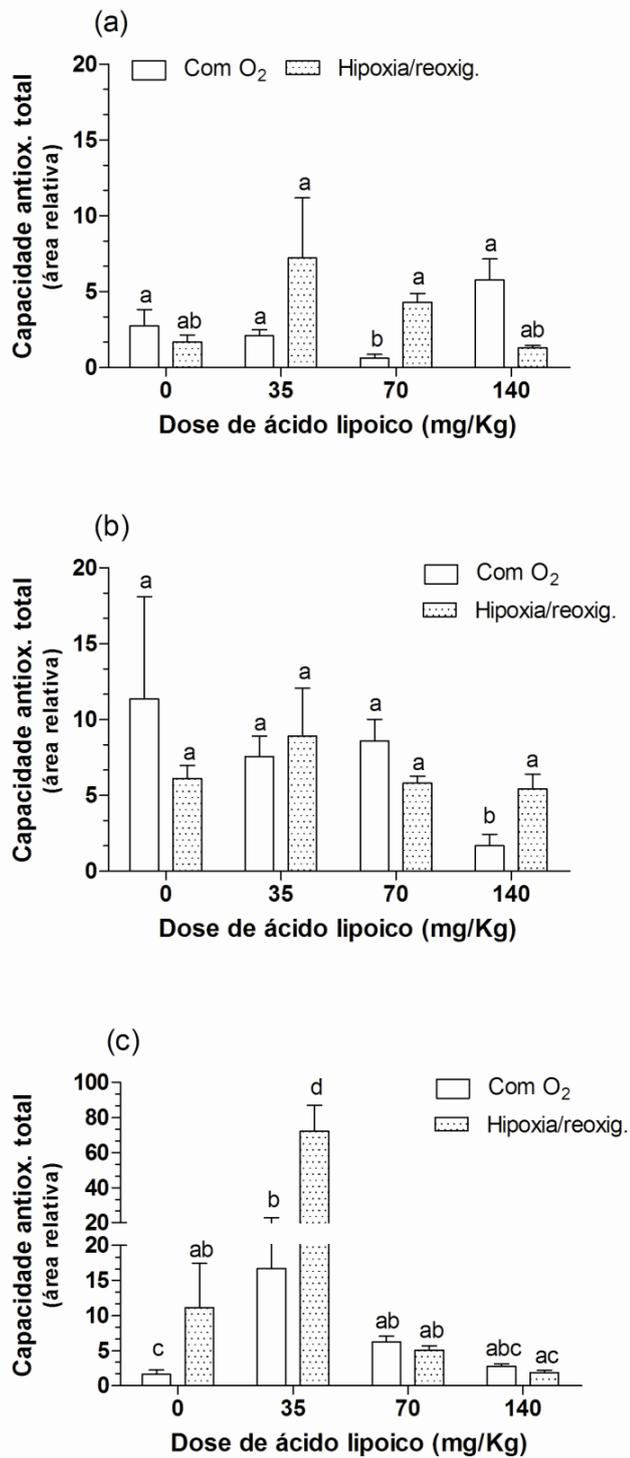


Figura 27 – Capacidade antioxidante total em brânquias de *L. vannamei* em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140 mg por 1 kg de ração) após: (A) 0,5 h; (B) 1 h; e (C) 4 h de re-oxigenação.

5.4.2 Hepatopâncreas

Em 0,5 h, tanto na situação normóxica quanto na situação de hipóxia/re-oxigenação não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos ($p>0,05$; Fig. 28A).

Em 1 h, efetuando contrastes ortogonais foi evidenciada um aumento da capacidade antioxidante total na situação normóxica nos camarões que receberam a dose de 70 mg AL/kg quando comparado com o grupo controle ($p<0,05$; Fig. 28B). Na condição de hipóxia/re-oxigenação não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p>0,05$; Fig. 28B).

Em 4 h, na situação normóxica não foram detectadas diferenças significativas ($p>0,05$; Fig. 28C). No entanto, na situação de hipóxia/re-oxigenação os contrastes ortogonais realizados indicaram um aumento da capacidade antioxidante total no grupo de 140 mg AL/kg quando comparado com o grupo controle ($p<0,05$; Fig. 28C).

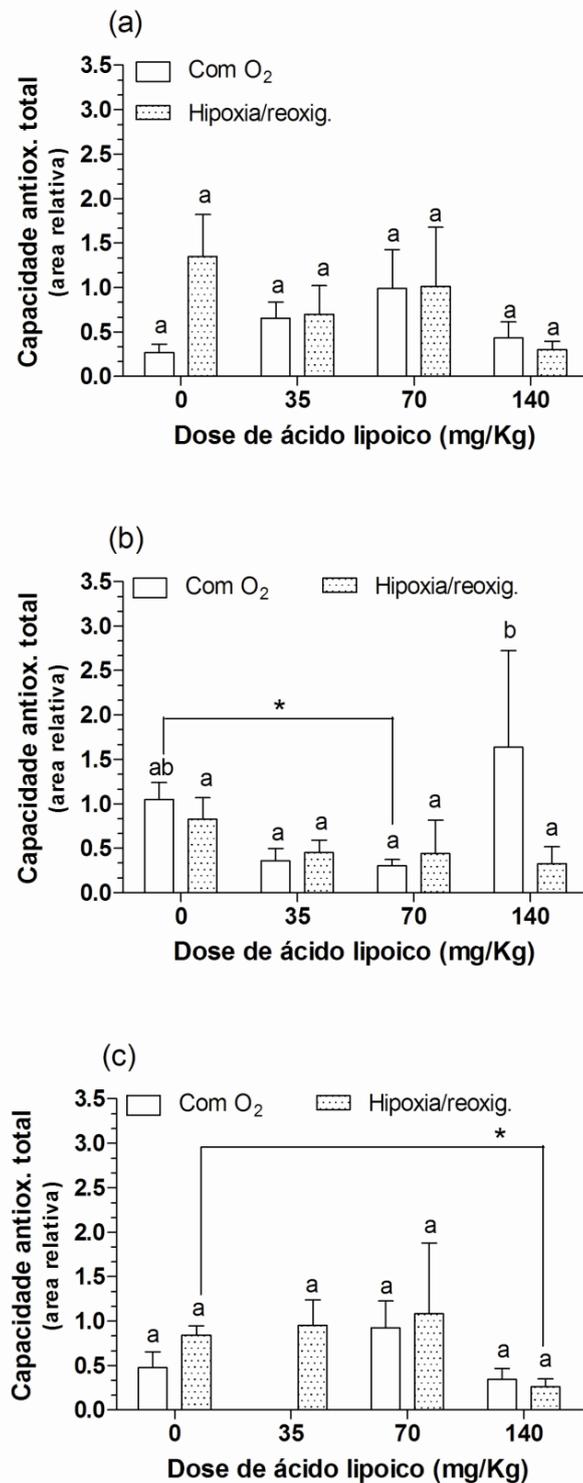


Figura 28 – Capacidade antioxidante total nem hepatopâncreas de *L. vannamei* em relação a diferentes concentrações de ácido lipóico (0, 35, 70 e 140 mg por 1 kg de ração) após: (A) 0,5 h; (B) 1 h; e (C) 4 h de re-oxigenação.

5.5 PESO

O ácido lipóico induziu um ganho relativo de peso nas doses de 70 e 140 mg AL/Kg quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 29). Não foram detectados mortalidade em nenhum tratamento.

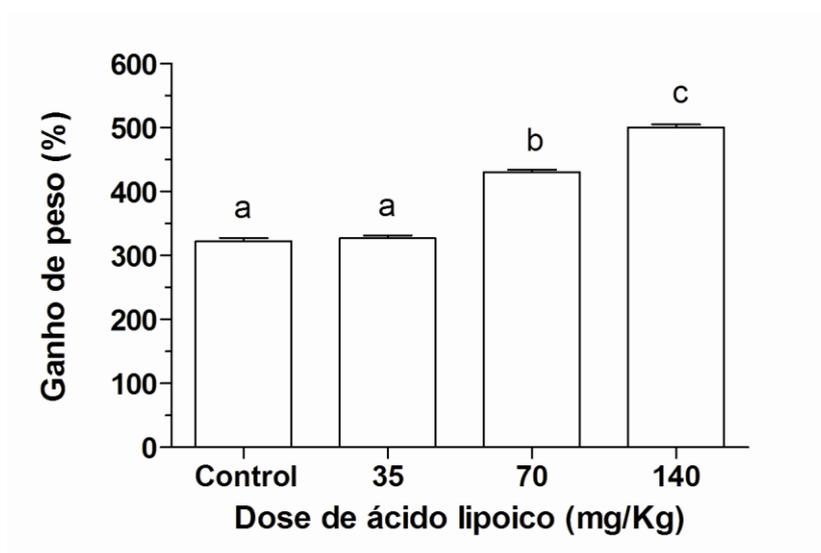


Figura 29 – Ganho de peso do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com rações com diferentes concentrações de ácido lipóico.

6 DISCUSSÃO

Após uma situação de hipóxia num ambiente de cultivo existe a possibilidade de que o dano causado pela re-oxigenação súbita seja de uma magnitude tal que as defesas antioxidantes próprias do organismo não sejam suficientes para impedir a geração de estresse oxidativo. Para tanto, foi adotada o uso de uma estratégia de suplementação de antioxidantes, especificamente do ácido lipóico (AL), baseando-se nos conceitos enunciados por Packer *et al.* (1995), que consideram que o AL obedece a critérios que o torna um antioxidante perfeito por quelar metal, ser facilmente absorvido pela dieta e interceptar os radicais livres seja em ambientes aquosos ou lipídicos.

O ácido lipóico tem sido referido como um antioxidante universal por atuar tanto na membrana quanto na fase aquosa da célula proporcionando proteção a membrana, devido sua interação com a vitamina C e glutathione, as quais por sua vez podem reciclar a vitamina E (Flora 2009). As propriedades do ácido lipóico incluem também a capacidade de reter espécies reativas de oxigênio (ERO) sendo estes radicais livres – radicais superóxido (O_2^-), radicais hidroxil (HO^\cdot) – ou não – peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – além de regenerar antioxidantes endógenos (Packer *et al.* 1995; Flora 2009; Kùlkamp 2009)

Dentre as principais enzimas da defesa antioxidante podem ser citadas a superóxido desmutase, a catalase, a glutathione peroxidase e a glutathione redutase, a produção destas enzimas podem ser induzidas por espécies reativas de oxigênio (ERO) e podem representar um aviso antecipado a sensíveis sinais incipientes de condições de estresse oxidativo (Booković *et al.* 2008).

Os parâmetros físicos e químicos e o uso do AL não foram fatores limitantes para o desempenho zootécnicos do camarão, visto que, o crescimento médio foi de $5 \text{ g} \pm 0,82$ em 45 dias e a sobrevivência foi de 100% constatando-se que estes fatores não causaram mortalidade no animal.

Em condição de normóxia, com 1 h de re-oxigenação, observou-se um efeito positivo do AL nas doses de 35 e 70 mg Al/kg em brânquias, não havendo diferença significativa entre os dois tratamentos. De forma geral, em brânquias, o melhor efeito do ácido lipóico em termos da atividade da GST deu-se com 70 mg por 1 kg de ração,

no tempo de 1 h. Este resultado indica que o ácido lipóico auxilia na manutenção de boa capacidade de detoxificação quando o organismo do camarão sofre com variações bruscas de oxigênio dissolvido. Indo de encontro aos resultados apresentados no trabalho de Monserrat *et al.* (2008), no qual a atividade da GST não mostrou diferenças significativas em brânquias do peixe *Corydoras paleatus* suplementado com AL quando comparados com os controles (sem AL), sendo registradas diferenças apenas no cérebro. O trabalho de Ubirajara *et al.* (2005) determinou os efeitos da anóxia ambiental e diferentes períodos de re-oxigenação (20 minutos e 40 minutos) sobre o balanço oxidativo em brânquias do caranguejo *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. Estes autores registraram um aumento significativo da atividade de GST durante a anóxia em relação aos controles mantidos em condição aeróbica, porém após 20 minutos de re-oxigenação ocorreu diminuição significativa na atividade de GST. Observa-se então que a variação de oxigênio dissolvido acarreta danos oxidativos seja em ambiente natural ou em ambiente de cultivo e os efeitos danosos ao animal ocorrem em longo prazo. Isto sugere que, para o camarão, o uso do AL torna-se uma alternativa para reduzir estes efeitos.

No hepatopâncreas, o AL não promoveu um efeito marcante na atividade de GST; resultado este enfatizado pela baixa atividade da GST em todos os tratamentos (35, 70, 140 mg de AL por 1 kg de ração) e em todos os tempos (0,5h, 1h e 4h) que se torna mais evidente quando estes dados são comparados com as atividades da GST nas brânquias nas mesmas condições de tempo e tratamento. Deste modo o hepatopâncreas do camarão não aparenta ter uma elevada capacidade de detoxificação via reações de fase II quanto às brânquias. Resultados semelhantes foram obtidos por Pinho *et al.* (2005a,b), nos quais foram registradas menores atividades da GST no hepatopâncreas do que nas brânquias. Ainda, foi constatado que a suplementação com α -tocoferol induziu um menor incremento na atividade da GST branquial quando expostos à microcistina (Pinho *et al.* 2005a). O oposto foi observado por Zhang *et al.* (2010) em hepatopâncreas de juvenis do molusco *Haliotis discus hanna*, onde a atividade da GST foi significativamente influenciada pelo AL, sendo aumentada em abalones alimentados com dieta contendo 800 mg AL/kg, e diminuída no grupo suplementado com 3.200 mg AL/kg. Por estes dados pode-se supor que em hepatopâncreas a modulação da atividade da GST através do uso de um antioxidante ocorre apenas em altas doses, bem superiores

daquelas analisadas no presente trabalho. Ainda, é importante salientar os presentes dados mostraram, após 4 h, uma queda na atividade da GST no grupo de camarões mantidos em normóxia, um resultado qualitativamente semelhante ao de Zhang *et al.* (2010).

A glutathione-S-transferase pertence a um grupo de enzimas multifuncionais envolvidas na biotransformação e detoxificação de xenobióticos, sua grande característica é proteger as células auxiliando na detoxificação contra danos oxidativos e produtos derivados de processos peroxidativos (Van der Oost *et al.* 2003). Neste trabalho, com 1 h de re-oxigenação, observou-se um efeito positivo do AL nas doses de 35 e 70 mg AL/kg em brânquias, não havendo diferença significativa entre os dois tratamentos. De forma geral, em brânquias, o melhor efeito do ácido lipóico em termos da atividade da GST deu-se com 70 mg por 1 kg de ração, no tempo de 1 h, embora não haja diferença significativa quando comparado as duas condições (normóxia e hipóxia/re-oxigenação). Este resultado indica que o ácido lipóico auxilia na manutenção de boa capacidade de detoxificação quando o organismo do camarão sofre com variações bruscas de oxigênio dissolvido. Indo de encontro aos resultados apresentados no trabalho de Monserrat *et al.* (2008), no qual a atividade da GST não mostrou diferenças significativas em brânquias do peixe *Corydoras paleatus* suplementado com AL quando comparados com os controles (sem AL), sendo registradas diferenças apenas no cérebro.

O trabalho de Ubirajara *et al.* (2005) determinou os efeitos da anóxia ambiental e diferentes períodos de re-oxigenação (20 minutos e 40 minutos) sobre o balanço oxidativo em brânquias do caranguejo *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. Estes autores registraram um aumento significativo da atividade de GST durante a anóxia em relação aos controles mantidos em condição aeróbica, porém após 20 minutos de re-oxigenação ocorreu diminuição significativa na atividade de GST. Observa-se então que a variação de oxigênio dissolvido acarreta danos oxidativos seja em ambiente natural ou em ambiente de cultivo e os efeitos danosos ao animal ocorrem em longo prazo. Isto sugere que, para o camarão, o uso do AL torna-se uma alternativa para reduzir estes efeitos.

No hepatopâncreas, o AL não promoveu um efeito marcante na atividade de GST; resultado este enfatizado pela baixa atividade da GST em todos os tratamentos (35, 70, 140 mg de AL por 1 kg de ração) e em todos os tempos (0,5h, 1h e 4h) que se torna mais evidente quando estes dados são comparados com as atividades da GST nas brânquias nas mesmas condições de tempo e tratamento. Deste modo o hepatopâncreas do camarão não aparenta ter uma elevada capacidade de detoxificação via reações de fase II quanto às brânquias. Resultados semelhantes foram obtidos por Pinho *et al.* (2005a,b), nos quais foram registradas menores atividades da GST no hepatopâncreas do que nas brânquias. Ainda, foi constatado que a suplementação com α -tocoferol induziu um menor incremento na atividade da GST branquial quando expostos à microcistina (Pinho *et al.* 2005a). O oposto foi observado por Zhang *et al.* (2010) em hepatopâncreas de juvenis do molusco *Haliothis discus hanna*, onde a atividade da GST foi significativamente influenciada pelo AL, sendo aumentada em abalones alimentados com dieta contendo 800 mg AL/kg, e diminuída no grupo suplementado com 3.200 mg AL/kg. Por estes dados pode-se supor que em hepatopâncreas a modulação da atividade da GST através do uso de um antioxidante ocorre apenas em altas doses, bem superiores daquelas analisadas no presente trabalho. Ainda, é importante salientar os presentes dados mostraram, após 4 h, uma queda na atividade da GST no grupo de camarões mantidos em normóxia, um resultado qualitativamente semelhante ao de Zhang *et al.* (2010).

Na determinação dos níveis de peroxidação lipídica em brânquias, a ação do ácido lipóico foi eficaz, agindo de forma gradual ao decorrer do tempo após re-oxigenação (0,5; 1 e 4 h), tendo na concentração de 70 mg de AL para 1 kg de ração a dose mais eficiente. No trabalho de Ubirajara *et al.* (2005) os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) em brânquias não mostraram nenhuma diferença significativa seja durante e após 20 minutos de recuperação aeróbica, contudo após 40 minutos de recuperação houve um aumento significativo de TBARS comparados aos controles. Assim sendo, o processo de re-oxigenação em crustáceos de fato induz estresse oxidativo, no entanto, mais uma vez o AL mostrou-se eficaz na recuperação do organismo com o desequilíbrio oxidativo. No hepatopâncreas, ao se comparar as situações de normóxia e hipóxia/re-oxigenação, o ácido lipóico teve um efeito protetor após 0,5 h, uma vez que no grupo controle foi verificado um aumento dos níveis de

TBARS, resposta que não foi observada nos grupos que tiveram suplementação com este antioxidante. No entanto, 1 e 4 h após a re-oxigenação foram registradas respostas pró-oxidantes tanto na condição normóxica (35 mg/kg) quanto na condição de hipóxia/re-oxigenação. Neste caso, o AL pode ter atuado como agente pro-oxidante do mesmo modo como ocorreu no trabalho de Zhang *et al.* (2010), no qual o nível de peroxidação lipídica no hepatopâncreas não foi significativamente influenciados pela dieta com AL. Além disto, no trabalho de Zenteno-Savín *et al.* (2006) onde o camarão *L. vannamei* foi exposto à hipóxia ($1,0 \pm 0,05$ mg O₂/L) por até 24h, os efeitos da re-oxigenação foram observados principalmente nas primeiras horas (6 e 12h) no hepatopâncreas. Os resultados destes autores indicam que a exposição à hipóxia não induz estresse oxidativo nos tecidos, sendo a re-oxigenação súbita após hipóxia o processo que de fato induz estresse oxidativo no hepatopâncreas.

Neste trabalho, a capacidade antioxidante nas brânquias obteve melhores resultados com aeração constantes para a dose de 70 mg/kg, após 0,5 h e na dose de 140 mg/kg após 1 h. Resultado semelhante foi observado para a dose de 70 mg/kg no hepatopâncreas após 1 h e na dose de 140 mg/kg após 4 h. Deste modo a capacidade antioxidante tem relação direta com tempo/dose, ou seja, com aumento do tempo de re-oxigenação a capacidade antioxidante aumentou com o aumento da dosagem de ácido lipóico. Essa relação pode ter conexão com a variação da defesa antioxidante ao longo do dia como constatado no trabalho de Maciel *et al.* (2004) onde os maiores níveis de defesa oxidante em brânquias e hepatopâncreas do caranguejo *Neohelice (Chasmagnathus) granulata* ocorria em período de maior atividade do animal, período de locomoção e alimentação, propondo-se então que em momentos de maior consumo de oxigênio é o momento de maior produção de ERO.

No trabalho de Ubirajara *et al.* (2005) não houve alteração na capacidade antioxidante durante a anóxia nas brânquias; no entanto após 20 e 40 minutos de re-oxigenação houve um aumento significativo em relação ao período de anóxia. No trabalho de Zhang *et al.* (2010), a capacidade antioxidante no hepatopâncreas do molusco *Haliotis discus hanna* aumentou significativamente nos tratamentos 200, 400 e 800 mg/kg, porém nas doses de 1.600 e 3.200 mg/kg foi verificada uma queda da capacidade antioxidante, portanto os autores concluem que para abalone a melhor

complementação da dieta com AL estão entre as doses de 200 a 800 mg/kg de AL e que suplementos dietéticos superior de AL, entre 1.600 e 3.200 mg/kg poderia funcionar como pró-oxidante do mesma forma como foi observado no presente trabalho com os níveis de peroxidação lipídica, que nas maiores doses o AL exerceu um efeito pró-oxidante em hepatopâncreas de *L. vannamei*.

No trabalho de Garcia (2010), a exposição com AL aparentemente induziu um efeito anoréxico no peixe *Danio rerio* (zebrafish), já que os organismos submetidos ao AL não apresentaram comportamento alimentar na presença da ração quando comparados aos do grupo controle (sem AL). No presente trabalho AL induziu aumento de peso no camarão *L. vannamei* nas maiores doses de 70 e 140 mg de AL para cada 1 kg de ração (peso inicial de 2,07 g \pm 0,24 e peso final de 7,94 g \pm 0,15), claramente indicando, a diferença do trabalho de Garcia (2010), que o AL não prejudicou a alimentação de *L. vannamei*. Já no trabalho de Zhang *et al.* (2010) com moluscos, constatou-se aumento de peso no grupo de 800 mg/kg (dose intermediária) e redução de peso no grupo com 3.200 mg/kg (dose maior) que foi relacionado com a capacidade antioxidante, o que quer dizer que as tendências na mudança no crescimento com a aplicação de AL como suplemento alimentar apresenta considerável semelhança com o aumento da capacidade antioxidante, embora este autores ressaltem que ainda se faz necessário mais estudo para afirmar esta constatação. Ainda deve ser considerado quando se faz referência a competência antioxidante a que espécie oxidante está se especificamente falando. No presente trabalho foi sim observado que em algumas horas de exposição às maiores doses de AL (70 e 140 mg/kg) induziram um aumento de competência antioxidante contra peroxi-radicais e isto aconteceu em paralelo com um aumento de peso.

7 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados pode-se concluir que:

O camarão *Litopenaeus vannamei* é resistente ao AL em dose intermediárias (140 mg/kg), uma vez que não houve mortalidade quanto o uso do ácido lipóico a nenhum dos tratamentos aplicados (35, 70 e 140 mg/kg).

Por apresentar melhor resposta em quase todas as análises bioquímicas, principalmente em brânquias, a dose indicada para o camarão *L. vannamei* é de 70 mg para cada 1 kg de ração.

Sendo assim, uso de ácido lipóico na ração de *L. vannamei* tem viabilidade científica nos índices zootécnicos por induzir crescimento e prover resistência fisiológica do camarão frente às re-oxigenação súbita.

8 REFERÊNCIAS

- AMADO, L.L., M.L. GARCIA, P.B. RAMOS, R.F. FREITAS, B. ZAFALON, J.L.R. FERREIRA, J.S. YUNES, J.M. MONSERRAT. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407: 2115-2123.
- ANDERSON, M.E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemical Biology International*. 111/112: 1-14.
- BARREIROS, A.L.B.S., J.M. DAVID, J.P. DAVID. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 29: 113-123.
- BIEWENGA, G.P.H., G.R.M.M. HAENEN, A. BAST. 1997. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology*. 29: 315–331.
- BISBAL, C., K. LAMBERTA, A. AVIGNONA. 2010. Antioxidants and glucose metabolism disorders. *Current Opinion in Clinical nutrition and Metabolic Care*. 13: 439-446.
- BORKOVIĆ, S.S., S.Z.PAVLOVIĆ, T.B.KOVAČEVIĆ, A.Š.ŠTAJN, V.M.PETROVIĆ, Z.S. SAIČIĆ. 2008. Antioxidant defense enzyme activities in hepatopancreas, gill and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C 147: 122-128.
- CAVALLI, R.O., J.F. FERREIRA. 2010. O futuro da pesca e da aquicultura marinha no Brasil: A maricultura. *Ciência e Cultura*. São Paulo. nº 3, 62: 38-39.
- CARREAU, J.P. 1979. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Methods in Enzymology*. 62: 152–158.
- CORNET, S., C. BIARD, Y. MORET. 2007. Is there a role for antioxidant carotenoids in limiting self-harming immune response in invertebrates?. *Biology Letters*. 3: 284-288.
- DICKINSON, D.A., H.J. FORMAN. 2002. Cellular glutathione and cellular metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1019-1026.

DIEGUES, A.C. 2006. Para uma Aquicultura Sustentável do Brasil. NUPAUB, Center for Research on Human Population and Wetlands in Brazil, Banco Mundial, FAO. São Paulo – SP. nº3, 26p.

FAO. 2006. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. Food and Agriculture Organization (FAO) Fisheries Technical Paper. Rome. nº 500, 134p.

FAO.2008. The State of World Fisheries and Aquaculture 2008. Food and Agriculture Organization (FAO) Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture of the United Nations.Rome, 196p.

FERREIRA, C.P. 2000. Bioquímica. São Paulo. 4 ed. MNP Editora. 413p.

FERREIRA, A.L.A., L.S. MATSUBARA. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP. *Revista Associação Médica Brasileira*, 43 (1): 61-8.

FIGUEIREDO, R. In: Metodologias de estudo da célula II: Fracionamento celular, Análise química, Localização de moléculas. Disponível em: < http://ccfmup06.googlepages.com/BIOCEL_AULA_6.doc >. Acesso em 09 de dez. de 2010.

FLORA, S.J.S. 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 4: 191-206.

GARCIA, M.L. 2010. Modulação de defesas antioxidantes e geração de efeitos tóxicos em duas espécies de peixes expostos ao ácido lipóico. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande do Sul, 44 p.

HALLIWELL, B., J.M.C. GUTTERIDGE. 2007. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*, New York. 704p.

HERMES-LIMA, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: Free radicals and oxidizing agents in biology. Chapter 12. KB Storey (Ed.). Wiley Canada.

HOLTHUIS, L.B. 1980. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of interest to fisheries. FAO species catalogue, Roma: FAO, 1: 1-261.

HUBER, P.C., W.P. ALMEIDA, A. FÁTIMA. 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, São Paulo, nº 5, 31: 1170 - 1179.

IBAMA. 2008. Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Brasília. 174p.

KÜLKAMP, I.C., K. PAESE, S.S. GUTERRES, A.R. POHLMANN. 2009. Stabilization of lipoic acid encapsulation polymeric nanocapsules designed for cutaneous administration. *Química Nova*. São Paulo. nº 8, 32: 2078-2084.

LI, E., L. CHEN, C. ZENG, N. YU, Z. XIONG, X. CHEN, J.G. QIN. 2008. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 274: 80-86.

MACIEL, F.E., C.E. ROSA, E.A. SANTOS, J.M. MONSERRAT, L.E.M. NERY. 2004. Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Canadian Journal of Zoology*. 82: 1871-1877.

MOHANKUMAR, K., P. RAMASAMY. 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Research*. 115: 69-75.

MONSERRAT, J.M., J.V. LIMA, J.L.R. FERREIRA, D. ACOSTA, M.L. GARCIA, P.B. RAMOS, T.B. MORAES, L.C. SANTOS, L.L. AMADO. 2008. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish

Corydoraspaleatus (Callychthyidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 148: 287-292.

OTSUKA, P.A.L. 2004. Fisiopatologia. Rio de Janeiro. Editora Guanabara-Koogan. 105p.

PACKER, L., E.H. WILTF, H.J. TRITSCHLER. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology Medicine*, 19: 227-250.

PINHEIRO, W.C., J. AMARO FILHO, P.B. MARACAJÁ. 2007. Efeitos climáticos e físicos-químicos sobre a biologia do *Litopenaeus vannamei* cultivado em viveiro. *Revista Verde*. Mossoró, RN, Brasil, nº2, 2: 142-150.

PINHO, G.L.L., C. MOURA DA ROSA, F.E. MACIEL, A. BIANCHINI, J.S. YUNES, L.A.O. PROENÇA, J.M. MONSERRAT. 2005a. Antioxidant responses after microcystin exposure in gills of an estuarine crab species pre-treated with vitamin E. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61: 361-365.

PINHO, G.L.L., C. MOURA DA ROSA, F.E. MACIEL, A. BIANCHINI, J.S. YUNES, L.A.O. PROENÇA, J.M. MONSERRAT. 2005b. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61: 353-360.

RIEGEL, R. E. 2004. Bioquímica. 4 ed. São Leopoldo. Ed UNISINOS. 548 p.

SANCHES, E.G., R.W.V. SECKENDORFF, M.B. HENRIQUES, L. FAGUNDES, E. F. SEBATHIAN. 2008. Viabilidade econômica do cultivo de bijupirá (*Rachycentron canadum*) em sistema offshore. *Informações Econômicas*, 3: 1-10.

SANTOS, M.F., P.A. COELHO. 2002. Espécies exóticas de camarões peneídeos (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798 e *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) nos ambientes estuarinos e marinho do nordeste do Brasil. *Boletim Técnico Científico*. CEPENE, nº1, 10: 65-77.

SÖDERHÄLL, K., L. CERENIUS. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion Immunology*. 10: 23-28.

- TRATTNER, S., J. PICKOVA, K.H. PARK, J. RINCHARD, K. DABROWSKI. 2007. Effects of α -lipoic and ascorbic acid on the muscle and brain fatty acids and antioxidant profile of the South American pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*. 273: 158-164.
- TERJESEN, B.F., K. PARK, M.B. TESSER, M.C. PORTELLA, Y. ZHANG, K. DABROWSKI. 2004. Lipoic acid and ascorbic acid affect plasma free amino acids selectively in the teleost fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *American Society for Nutritional Sciences*, 134: 2930-2934.
- UBIRAJARA, O.O., A.R. ARAÚJO, A.B.KLEINB, R.S.M. SILVA, L.C. KUCHARSKIA. 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part B 140: 51-57.
- VAN DER OOST, R., J. BEYER, N.P.E. VERMEULEN. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13: 57-149.
- WAJNER, M., A. LATINI, A.T.S. WYSE, C.S. DUTRA-FILHO. 2004. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 27: 427-448.
- ZENTENO-SAVÍN, T., R. SALDIERNA, M. AHUEJOTE-SANDOVAL. 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in culture shrimp. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C 142: 301-308.
- ZHANG, W., O. CHEN, K. MAI, W. XU, X. WANG, Z. LIUFU. 2010. Effects of dietary α -lipoic acid on the growth and antioxidative responses of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture Research*. 41: 781-787.
- ZHOU, J., W. WANG, A. WANG, W. HE, Q. ZHOU, Y. LIU, J. XU. 2009. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and regulation under pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C 150: 224-230.