

DOUGLAS LEMOS DE SOUZA

**REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DA BUTIRILCOLINESTERASE ATRAVÉS DO
USO DE ADITIVOS ALIMENTARES E SUA APLICAÇÃO EM RAÇÕES PARA
CAMARÃO MARINHO**

Recife,
Abril/2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

BACHAREL EM ENGENHARIA DE PESCA

**REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DA BUTIRILCOLINESTERASE ATRAVÉS DO
USO DE ADITIVOS ALIMENTARES E SUA APLICAÇÃO EM RAÇÕES PARA
CAMARÃO MARINHO**

DOUGLAS LEMOS DE SOUZA

Equiparação de ESO em iniciação científica apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como exigência para obtenção do Bacharel em Engenharia de Pesca.

Prof^ª. Dra. Juliana

Ferreira Santos

Recife,

Abril/2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S729r

Souza, Douglas Lemos de
REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DA BUTIRILCOLINESTERASE ATRAVÉS DO USO DE ADITIVOS
ALIMENTARES E SUA APLICAÇÃO EM RAÇÕES PARA CAMARÃO MARINHO : REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DA
BUTIRILCOLINESTERASE / Douglas Lemos de Souza. - 2023.
32 f.

Orientadora: Juliana Ferreira Santos.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em
Engenharia de Pesca, Recife, 2023.

1. Nutrição. 2. Enzima . 3. Inovação. 4. Dieta. I. Santos, Juliana Ferreira, orient. II. Título

CDD 639.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

BACHAREL EM ENGENHARIA DE PESCA

**REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DA BUTIRILCOLINESTERASE ATRAVÉS DO
USO DE ADITIVOS ALIMENTARES E SUA APLICAÇÃO EM RAÇÕES PARA
CAMARÃO MARINHO**

Douglas Lemos de Souza

ESO/TCC julgado adequada para
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Pesca. Defendida e
aprovada em 19/04/2023 pela seguinte
Banca Examinadora.

Prof^a. Dra. Juliana Ferreira Santos

(Orientadora)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof^a Dra. Gelcirene de Albuquerque Costa

(Membro titular)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

M.a Maria Angélica da Silva

(Membro titular)

[Departamento de Bioquímica e Fisiologia]

[Universidade Federal de Pernambuco]

Dr. Luciano Clemente da Silva

(Membro suplente)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Agradecimentos

Primeiramente a Deus e aos meus familiares por toda força e incentivo. Não há palavras para descrever toda gratidão que eu sinto nesse momento, vocês são tudo para mim.

Minha companheira da vida (uma das maravilhas que o curso me proporcionou), Karolayne Ribeiro da Silva Oliviera, principalmente pela paciência, companheirismo, que sempre me apoio em tudo. Agradeço muito pelos amigos que conquistei aqui na “Rural”, por todo apoio que tive e por tudo que enfrentamos ao longo do curso, cada um teve papel importante na minha caminhada até aqui. Amigos esses que eu levo para vida, obrigada Rural! Quero agradecer também a minha querida orientadora Juliana Ferreira Santos, pela confiança que em mim foi colocada, por estar sempre disposta a ouvir e aconselhar.

RESUMO

O *Litopenaeus vannamei* é a espécie de crustáceos mais cultivada no mundo, representa 51.7% da produção total. No Brasil a espécie lidera a carcinicultura nacional faturando cerca de R\$1,6 milhão. Buscando otimizar os cultivos, novos métodos de regulação fisiológica podem gerar resultados importantes. A investigação da modulação da ação de enzimas dos sistemas endócrino/digestório é uma alternativa com potencial para obtenção de resultados significativos. Recentemente, foi proposto que a enzima butirilcolinesterase (BChE) tem um papel no metabolismo da grelina, conhecida como “hormônio da fome” podendo influenciar no consumo de ração e no desempenho produtivo. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito *in vitro* de inibidores da BChE como ferramenta fisiológica através do uso de aditivos alimentares e sua aplicação em rações para camarão marinho. Juvenis de *L. vannamei* em fase de engorda (2g, 4g e 6g) foram obtidos com produtor local e realizaram-se teste de atividade enzimática em diferentes tecidos (olho, músculo e hepatopâncreas) utilizando como comparação o parâmetro IC₅₀ (concentração que inibe a atividade enzimática em 50%). Testes foram feitos para avaliar o efeito inibitorio das plantas: rúcula (*Eruca sativa*), acelga (*Beta vulgaris*) e espinafre (*Spinacea oleracea*). Os melhores resultados de inibição foram: rúcula IC₅₀: 0,019µg/mL em camarões de 6g; acelga IC₅₀: 0,14µg/mL em camarões de 4g e espinafre IC₅₀: 0,20µg/mL em camarões de 4g, a acelga demonstrou melhores resultado para uso como aditivo. A ração foi processada e extratos inibidores foram acrescentados a ração, em amostras diferentes, com o uso de álcool de cereais como veículo incorporador. Conduziu-se então as avaliações físicas e bromatológicas, nos testes físicos as rações repeletizadas apresentaram diferença apenas na densidade aparente, mesmo as rações repeletizadas sendo mais densas a flutuabilidade não foi afetada, para os testes bromatológicos apresentaram apenas menor umidade, devido ao tempo de estufa. Pode-se concluir que os indivíduos de peso médio (4 g) apresentam maior atividade BChE, sugerindo essa fase como a ideal para a introdução de rações com inibidores de BChE e que inclusão de aditivos na alimentação de camarões, pelo método de repeletização, pode ser utilizado sem prejudicar a qualidade nutricional e física da ração.

Palavras-chave: 1. Nutrição 2. Enzima 3. Inovação 4. Dieta

ABSTRACT

Litopenaeus vannamei is the most cultivated crustacean species in the world, representing 51.7% of total production. In Brazil, the species leads the national shrimp farming earning about R\$1.6 million. Seeking to optimize cultures, new methods of physiological regulation can generate important results. The investigation of the modulation of the action of enzymes in the endocrine/digestive systems is an alternative with the potential to obtain significant results. Recently, it was proposed that the enzyme butyrylcholinesterase (BChE) plays a role in the metabolism of ghrelin, known as the “hunger hormone” and may influence feed intake and productive performance. The present study aimed to investigate the *in vitro* effect of BChE inhibitors as a physiological tool using food additives and their application in marine shrimp diets. Juveniles of *L. vannamei* in the fattening phase (2g, 4g and 6g) were obtained from a local producer and enzyme activity tests were carried out in different tissues (eye, muscle and hepatopancreas) using the IC₅₀ parameter (concentration that inhibits the enzymatic activity by 50%). Tests were carried out to evaluate the inhibitory effect of the following plants: arugula (*Eruca sativa*), Swiss chard (*Beta vulgaris*) and spinach (*Spinacea oleracea*). The best inhibition results were arugula IC₅₀: 0.019µg/mL in 6g shrimp; chard IC₅₀: 0.14µg/mL in 4g shrimp and spinach IC₅₀: 0.20µg/mL in 4g shrimp, chard showed better results for use as an additive. The feed was processed, and inhibitor extracts were added to the feed, in different samples, using grain alcohol as an incorporating vehicle. The physical and bromatological evaluations were then conducted, in the physical tests the repelletized rations showed a difference only in apparent density, even the repelletized rations being denser the buoyancy was not affected, for the bromatological tests they only showed lower humidity, due to the time in the oven. It can be concluded that individuals of average weight (4 g) have greater BChE activity, suggesting that this phase is ideal for introducing feeds with BChE inhibitors and that the inclusion of additives in shrimp feed, using the repellent method, can be used without impairing the nutritional and physical quality of the feed.

Keywords: 1. Nutrition 2. Enzyme 3. Innovation 4. Diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	18
Figura 2	19
Figura 3	20
Figura 4	21
Figura 5	22
Figura 6	22
Figura 7	23
Figura 8	23
Figura 9	24
Figura 10	25
Figura 11	25
Figura 12	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	20
Tabela 2.....	27
Tabela 3.....	27
Tabela 4.....	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos.....	14
3. METODOLOGIA	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO GERAL

O camarão *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), é uma espécie distribuída ao longo da costa do Pacífico da América do Sul, do Peru ao México. É claramente encontrado nas áreas costeiras do Equador e é cultivado na maioria das áreas de produção de camarão. O *L. vannamei* apresenta em geral taxa de crescimento uniforme, fácil adaptabilidade a diferentes condições físico-químicas do meio em que vive, como por exemplo salinidade e temperatura. Pode atingir 230 milímetros de comprimento e seu comportamento reprodutivo no cativeiro mostra maior sobrevivência em laboratório. Possui ótima receptividade no mercado global, o que aumenta a segurança dos investidores (MAGALHÃES, 2004). É a espécie de crustáceo mais cultivada no mundo. O uso comercial da espécie tem crescido exponencialmente nos últimos anos.

A produção mundial apresenta um crescimento acentuado nos últimos anos. Entre os anos de 2015 e 2019 a pesca do camarão caiu 9,4% enquanto o cultivo obteve um incremento de 36%. Assim a carcinicultura do camarão *L. vannamei* corresponde por maior parte da produção (51,7% da produção total de crustáceos) gerando aproximadamente de 5.81 milhões de toneladas (FAO, 2022; VIDAL, 2022). No Brasil, apesar do setor ainda necessitar de desenvolvimento de tecnologias que tem como objetivo melhorar o cultivo e a relação custo-benefício (SANTOS et al. 2011, 2020), a espécie é a mais produzida na carcinicultura nacional, produzindo 78,6 mil toneladas, faturando cerca de R\$1,6 milhão. A região Nordeste é a principal produtora, com destaque para Estados como: Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba (IBGE, 2021).

Buscando uma maior produtividade, reduzir gastos e sustentabilidade, novos métodos que propõem regulação fisiológica das espécies que aceleram o crescimento e reduzem o tempo de cultivo podem ser importantes. Entre eles, a investigação da modulação da ação de enzimas dos sistemas endócrino/digestório são alternativas com potencial para obtenção de resultados importantes sem grandes alterações no manejo das espécies.

As colinesterases (ChE; EC 3.1.1.x) são enzimas hidrolases, com afinidade por ésteres de colina (TURKAN et al., 2019). Atualmente, são aceitas duas ChEs, acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), cujas atividades diferem entre si pela afinidade por tipos de substratos (SILMAN e SUSSMAN, 2005). A butirilcolinesterase não possui função totalmente esclarecida, e diversas pesquisas estão sendo elaboradas a esse respeito (BALASUBRAMANIAN e BANUMATHY, 1993; MESULAM et al., 2002; ÇOKUGRAS, 2003; BRIMIJOIN et al., 2016).

Entre essas pesquisas, uma indica que a grelina, conhecida como “hormônio da fome”, seria um substrato fisiológico da BChE, impactando no consumo de alimento e no metabolismo de lipídeos e da glicose (BRIMIJOIN et al., 2016). A grelina é um peptídeo com cerca de 11 formas moleculares, variando de 12 a 28 aminoácidos, recentemente encontrado em crustáceos (PARHAR et al., 2003; UNNIAPPAN e PETER, 2005; FOX et al., 2009; KAIYA et al., 2011; JÖNSSON, 2013; MARTÍNEZ et al., 2017).

A atividade BChE foi reportada em *Artemia salina*, *Carcinus maenas*, *Palaemon serratus*, *Procambarus clarkii* e *L. vannamei* (ACEY et al., 2002; GHEDIRA et al., 2007; FRASCO et al., 2010; PEZZEMENTI e CHATONNET, 2010; JOHNSON e MOORE, 2012). Essa atividade sofre inibição específica por diversos compostos sintéticos e naturais que podem modular seu desempenho, impedindo a hidrólise da grelina (hormônio da fome) e prolongar sua ação. Dentre os sintéticos, estão Iso-OMPA, percaína, isopestox, etopropazina, bambuterol e haloxon (ASSIS et al., 2011). Dentre os naturais, Boga et al. (2011) descreveram pelo menos quatro plantas de fácil aquisição que possuem diversas moléculas com potencial inibitório para as ChEs (aipo, beterraba, espinafre e rúcula) cujo extratos inibem a BChE e não a AChE (característica importante para não gerar danos ao organismo).

Aditivos são utilizados amplamente e podem promover uma série de benefícios para os organismos aquáticos e/ou o meio que vivem, eles podem ser incorporados de várias formas seja direto ao meio ou em dietas ofertadas (SADO, 2008), uma alternativa para isso pode ser o processo de repeletizar rações incorporando aditivos benéficos aos organismos. O processo de moagem pode garantir uma melhor exposição durante o processo digestivo de organismos aquáticos (POLESE, 2013), podendo gerar maiores coeficientes de digestibilidade e assim maior produtividade. Por outro lado, a escolha errada de tamanho dos peletes, pode aumentar o consumo de energia em fábricas de rações e resultando em aumento dos custos de produção (GENTELINI et al., 2005).

O período de privação de alimentos, a inibição ou baixa atividade da BChE em ratos e humanos, foi descrito respectivamente por Brimijoin et al. (2016) e Chen et al. (2017), mas não foi avaliado em crustáceos e apresenta potencial para maximizar o desempenho produtivo das espécies de importância comercial. Dessa forma o presente trabalho teve como objetivos observar a eficiência de extratos inibidores de butirilcolinesterase (BChE) com aplicação na dieta de camarão marinho e avaliar as rações que passaram pelo método de repeletização quanto a sua composição e estabilidade, tendo em vista que dietas para camarões têm alta exigência de qualidade física do pellet por isso sua qualidade física e química deve ser avaliada após a repeletização.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Investigar o efeito *in vitro* de inibidores da BChE como ferramenta fisiológica através do uso de aditivos alimentares e sua aplicação em rações para camarão marinho.

2.2 Específicos

- Determinar a atividade basal da BChE e AChE no hepatopâncreas do camarão *L. vannamei* com diferentes faixas de peso;
- Selecionar inibidores naturais da BChE de *L. vannamei*, provenientes de plantas comestíveis, comparando seu efeito *in vitro* ao efeito de um inibidor sintético;
- Obtenção de dieta com a inclusão do extrato com potencial inibitório de BChE;
- Avaliação da qualidade física e bromatológica das dietas para camarões com a inclusão de aditivo.

3. METODOLOGIA

Atividade basal da BChE e AChE no camarão *Litopenaeus vannamei*

300 Juvenis de *L. vannamei* (em fase de engorda) com massa médias de $2,00 \pm 0,90$, $4,15 \pm 1,34$ e $6,23 \pm 1,30$ g foram obtidos de produtor local. A predominância de cada enzima (BChE e AChE) foi determinada nos tecidos: olho, músculo e hepatopâncreas através do uso dos substratos específicos acetilcolina, propionilcolina e S-butirilcolina (ASCh, PSCh e BSCh, respectivamente) e inibidores seletivos anti-AChE, anti-BChE e anti-ChE (Bw284c51, Iso-OMPA e eserina, respectivamente), utilizando como comparação o parâmetro IC₅₀ (concentração do composto que inibe a atividade enzimática em 50%), de acordo com o método colorimétrico de Assis et al. (2014). Após a comprovação da atividade BChE nos hepatopâncreas dos camarões, esse tecido extraído de indivíduos das três classes de peso investigadas, foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 até a concentração de 20 mg de tampão/mL de tecido. Em seguida, foram centrifugados a 1000 x g por 10 min e foi coletado o sobrenadante (extrato bruto) e congelado a -20 °C. Para atividade da BChE, 20 µL do sobrenadante foram adicionados ao reagente cromogênico DTNB 0,25 mM (200 µL) e o substrato BSCh 62 mM (20 µL) foi adicionado imediatamente antes da leitura a 405 nm durante

3 min. Uma unidade de atividade enzimática para ambos os ensaios (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1 μmol de substrato por minuto, por mL de solução. Os brancos foram preparados utilizando o tampão Tris-HCl a 0,5 mol/L, pH 8,0 em substituição às amostras. O teor de proteína foi estimado de acordo com Sedmak and Grossberg (1977), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

Seleção de inibidores naturais da BChE de *L. vannamei* provenientes de plantas comestíveis

Os extratos aquosos de plantas (1 mg/mL) que contêm inibidores de BChE foram selecionados por meio do ensaio de inibição de acordo com Assis et al. (2014) utilizando espécies com atividade anti-BChE descritas na literatura (BOGA et al., 2011): acelga (*Beta vulgaris*), espinafre (*Spinacea oleracea*) e rúcula (*Eruca sativa*) em cinco concentrações crescentes (0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01 e 1 mg/mL) para assim determinar o IC₅₀ - concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática - de BChE. Dez microlitros dos extratos aquosos de cada planta foram incubados com 10 μL do extrato enzimático por 60 min. Em seguida, as atividades de BChE e AChE foram determinadas como descrito anteriormente. A atividade residual foi calculada em relação aos controles (ausência de extrato de plantas como 100% de atividade). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da atividade residual em porcentagem (média \pm DP) versus concentrações dos extratos vegetais.

Preparação das dietas para *L. vannamei* com adição do aditivo

Após a seleção dos extratos, foram preparados 3 tratamentos; O controle (sem adição do inibidor), natural (com a inclusão do inibidor natural de BChE, extrato vegetal etanoico de Acelga (*Beta vulgaris* var. cicla) e sintético (com o inibidor sintético de BChE - Iso-OMPA).

Foi adquirida ração comercial para camarão marinho na fase de engorda com 35%PB, a adição dos aditivos foi realizada de acordo com Kaleeswaran *et al.*, 2011 e o método de repetitização da ração foi segundo Dairiki *et al.*, 2013; Heluy *et al.*, 2020. A ração foi inicialmente moída em um moinho de faca. Em seguida, os aditivos foram acrescentados a ração, em amostras diferentes, com o uso de álcool de cereais como veículo incorporador. Após uma pré-mistura, foi adicionada água destilada a 55°C e a ração foi novamente misturada, até formar uma consistência semissólida. Finalmente, a ração foi repetitizada, utilizando um moedor de carnes de 2 mm de abertura, e seca em estufa a 55 °C por 24 horas.

Bromatologia

A análise bromatológica da ração repeletizada foi realizada no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL), Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, onde foi avaliado a umidade (AOAC, 1996, método 926.12), cinzas (AOAC, 1996b, método 920.39), proteínas (AOAC, 1996a, método 991.20), lipídeos U.K. FEEDING STUFFS, 1982, pp. 9–11) e carboidratos, quantificados por diferença, através da diferença entre os percentuais de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos, e valor calórico (WATT E MERRILL, 1963).

Rendimento (RE)

Foi calculada a partir da diferença de pesos entre a quantidade que foi processada no início e a quantidade depois de todo o processamento. (PRESTES, 2021)

$$\text{RE (g)} = \text{Peso inicial (g)} - \text{Peso final (g)}$$

Flutuabilidade (F)

A flutuabilidade foi determinada de acordo com a metodologia adaptada de Cian et al. (2018). Dez (10) peletes de ração foram colocados em um recipiente de 1000 mL com água à temperatura ambiente. O número de peletes flutuantes suspensos no recipiente foi observado após 1 minuto e a flutuabilidade foi calculada levando em consideração o tempo que os peletes demoraram para afundar.

Densidade Aparente (DA)

Em um recipiente cilíndrico com volume de 1000 mL, foram colocados os peletes de ração (n=10). Posteriormente o recipiente foi pesado em balança digital. A relação entre o peso dos peletes e o volume do recipiente cilíndrico (1000 mL) foi expressa como densidade aparente em g/l. (PRESTES, 2021)

Índice de Durabilidade dos Peletes (IDP)

O IDP foi calculado como descrito por Kamarudin et al. (2018). Amostras de 50 g de ração foram colocadas em equipamento para teste de durabilidade (friabilator, diâmetro de 30cm), submetidas a agitação por 10 minutos a uma velocidade de 25 rpm. Após agitação, as amostras foram peneiradas usando uma peneira de malha de 2,00 mm por 1 minuto. Os peletes restantes na peneira de 2,00 mm foram pesados e o índice de durabilidade dos peletes foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{IDP (\%)} = (\text{Peso dos peletes após o teste (g)} / \text{Peso do peletes antes do teste (g)}) \times 100$$

Índice de Absorção de Água (IAA)

Os índices de absorção de água foram obtidos conforme metodologia utilizada por Anderson (1969). Os peletes de ração foram moídos e peneirados usando uma peneira de 0,50 mm. O pó fino (peso seco da amostra 2,5 g) foi suspenso em água destilada (30 ml) a 30 °C e durante 30 minutos foram colocados em um agitador mecânico tipo vortex para garantir a homogeneização completa das amostras. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3000 g ou rcf por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um recipiente descartável de alumínio (tarado) e seco a 135 °C por 2 horas. O peso do gel remanescente no tubo centrifugado foi calculado como índice de absorção de água a partir da seguinte equação:

$$\text{IAA (g/g)} = (\text{Peso do gel (g)} / \text{Peso seco da amostra (g)})$$

Índice de Resistência a Água (IRA)

Amostras de 50g de peletes de ração foram adicionadas em recipientes com o volume útil de 1 litro de água a 30°C, agitados por 30 minutos (5 L/min) e filtrados através de uma peneira de malha (0,3 mm). Os peletes retidos na peneira foram secos em estufa por 24 h a 105 °C e pesados. A resistência à água foi calculada pela fórmula: (PRESTES, 2021)

$$\text{RA (\%)} = (\text{Quantidade de sólidos retidos (g)} / \text{Quantidade de amostras da ração seca (g)}) \times 100$$

Análise estatística

As amostras foram testadas quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e em seguida os testes de Levene e Brown-Forsythe para verificar a homogeneidade das variâncias. A diferença entre os grupos foi evidenciada após análise de variância (one-way ANOVA), seguida dos testes de Tukey e Bonferroni ao nível de significância de 5%. Análises de regressão linear e não-linear com ajustamento aos modelos dose-resposta, sigmoidal (Boltzmann) e polinomial também foram utilizados na avaliação dos resultados de inibição enzimática.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade BChE foi observada, através dos substratos específicos (ASCh, PSCh e BSCh), apenas no hepatopâncreas de *L. vannamei* (Figura 1). Nos demais tecidos, olho e músculo, apenas foi avaliada atividade AChE.

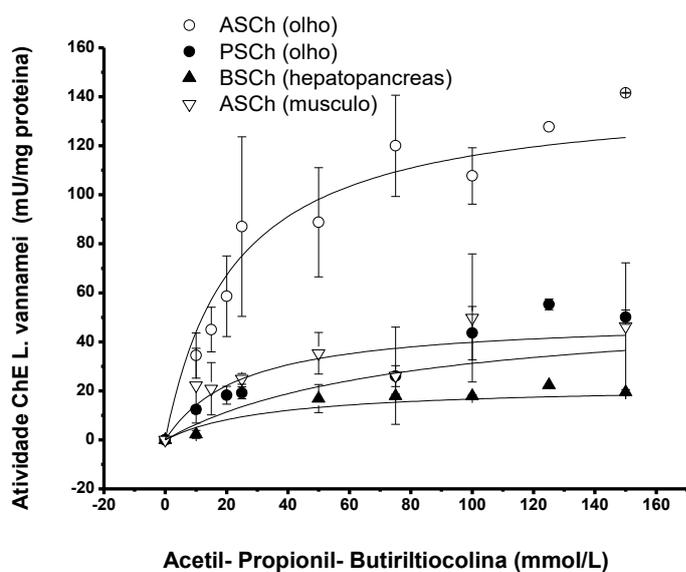


Figura 1 - Atividade ChE em três tecidos de *L. vannamei* (olho, músculo e hepatopâncreas) utilizando os substratos acetiltiocolina (ASCh), propioniltiocolina (PSCh) e butiriltiocolina (BSCh). Os ensaios foram realizados em quadruplicata (n = 10). Dados expressos como média \pm DP.

De acordo com a Figura 2 e a Tabela 1, a atividade ChE presente no hepatopâncreas de *L. vannamei* foi confirmada como atividade da BChE, uma vez que sofreu inibição reduzida por parte do inibidor seletivo da AChE (BW284c51) e forte inibição pelo inibidor específico da BChE (Iso-OMPA) e de ChEs totais, eserina, de acordo com os valores de IC_{50} .

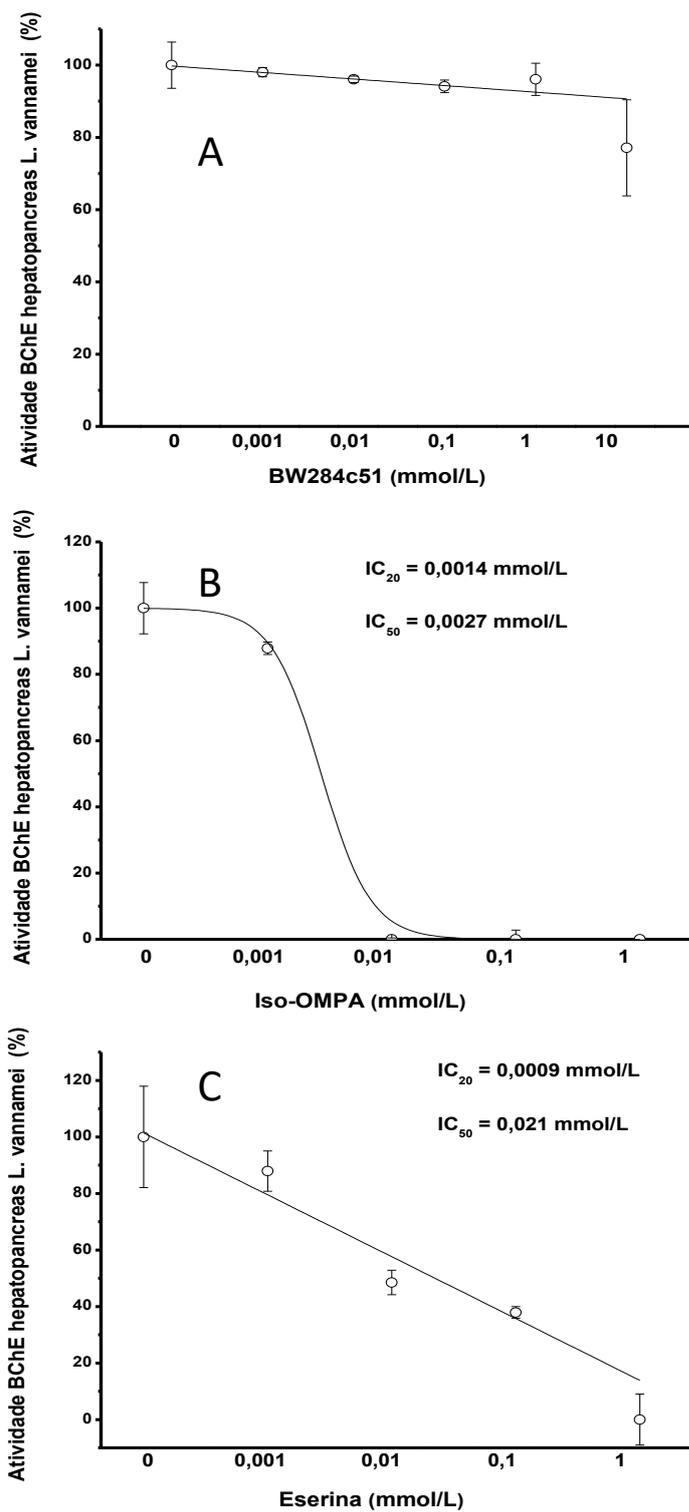


Figura 2 - Efeito de inibidores seletivos sobre a atividade BChE em hepatopâncreas de *L. vannamei* (A) – BW284c51; (B) – Iso-OMPA; (C) – Eserina. Os ensaios foram realizados em quadruplicata (n = 10). Dados expressos como média \pm DP.

Tabela 1 – Comparação entre valores de IC₅₀ estimados para atividade ChE em três tecidos de *L. vannamei* na presença de inibidores seletivos.

Inibidor	Olho	Músculo	Hepatopâncreas
	IC ₅₀ (μmol/L)		
BW284c51	83	9,3	-
Iso-OMPA	-	480	2,7
Eserina	27	3,2	21

Franco et. al., (2010) encontram porcentagens significativas da presença da atividade de BChE no hepatopâncreas, em outras espécies de camarão, quando comparado com outros tecidos como olhos e brânquias, e presença de atividade também reportada por Kim et. al., (2014) que utilizam subprodutos de 3 espécies camarão marinho distintas (*Pandalus borealis*, *Pandalus hypsinotus* e *Pandalopsis japonica*). Assim após a confirmação da atividade BChE no hepatopâncreas de *L. vannamei*, as amostras coletadas de indivíduos de três pesos (2, 4 e 6 g) tiveram suas atividades determinadas e comparadas, apresentando uma tendência de maior atividade para extratos de espécimes de 4 g e 2 g e menor para extratos de 6 g. Sendo o extrato de 4 g diferente estatisticamente diferente dos demais pesos (Figura 3).

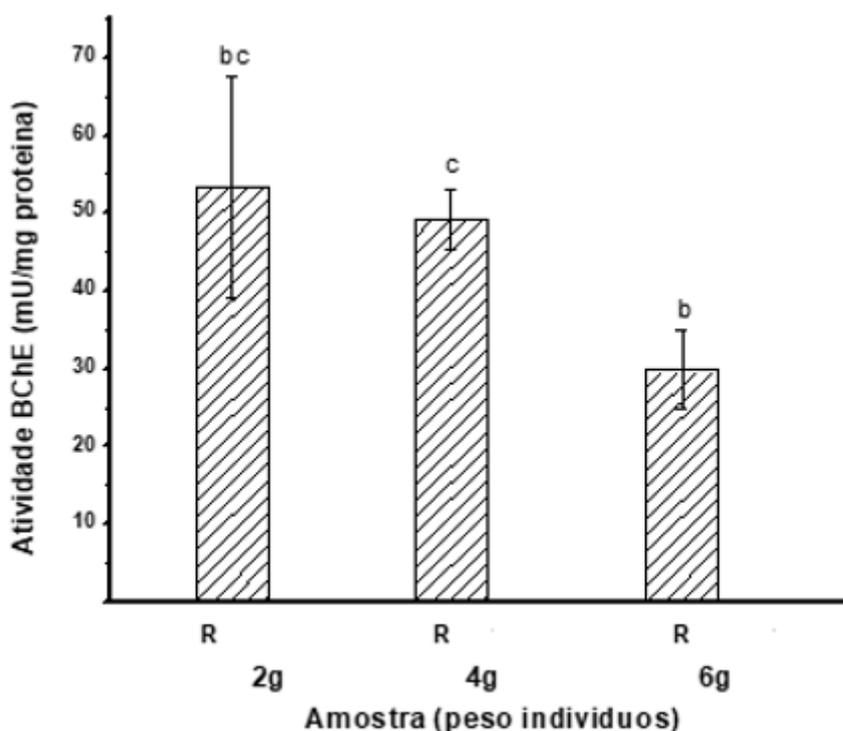


Figura 3 – Comparação entre atividades da BChE em hepatopâncreas de *L. vannamei* de três pesos (2, 4 e 6 g). Barras com mesma letra não diferiram significativamente ($p < 0,05$) de acordo com ANOVA seguida de teste Tukey e Bonferroni, após atenderem as premissas de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene e Brown-Forsythe).

A seleção dos extratos vegetais (rúcula, acelga, espinafre) como inibidores de BChE do hepatopâncreas iniciou-se pela investigação de seu efeito sobre a enzima desse tecido de espécimes dos três pesos em investigação, utilizando e comparando a amostras de tecidos (10 hepatopâncreas).

Rúcula

As Figuras 4,5 e 6 demonstram redução da atividade BChE (IC_{50} de 0,019 a 4,7 $\mu\text{g/mL}$) frente a concentrações crescentes do extrato de rúcula (*Eruca sativa*):

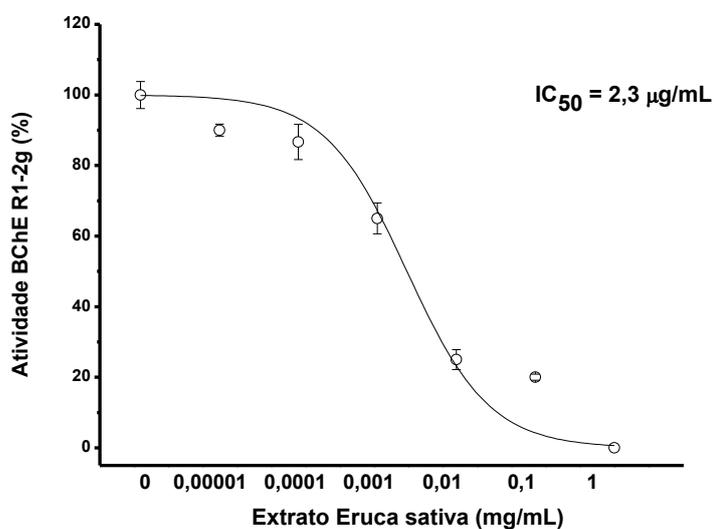


Figura 4 – Efeito do extrato de rúcula (*E. sativa*) sobre a atividade da BChE em hepatopâncreas de *L. vannamei* de 2 g (n = 10).

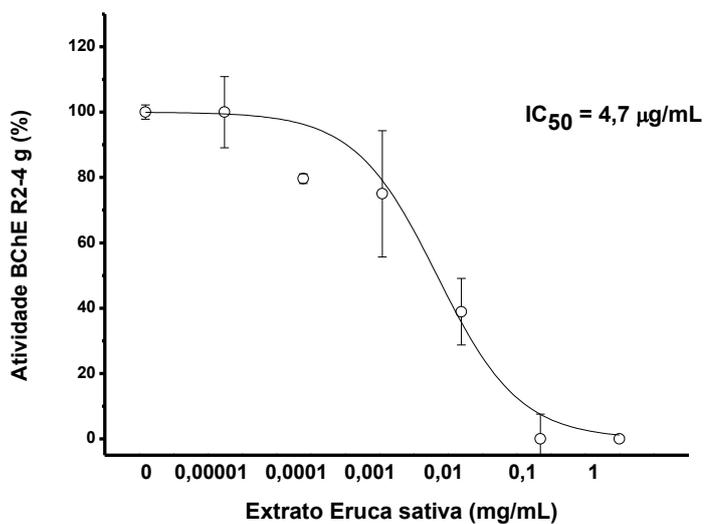


Figura 5 – Efeito do extrato de rúcula (*E. sativa*) sobre a atividade da BChE em hepatopâncreas de *L. vannamei* de 4 g (n = 10).

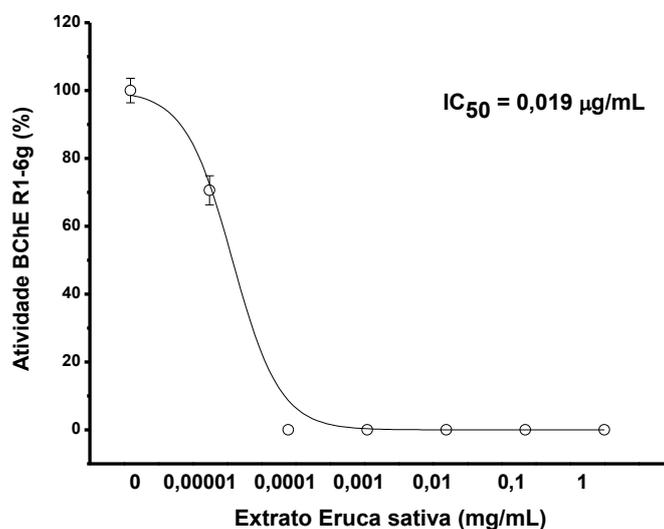


Figura 6 – Efeito do extrato de rúcula (*E. sativa*) sobre a atividade da BChE em hepatopâncreas de *L. vannamei* de 6 g (n = 10).

O potencial inibitório da rúcula (*E. sativa*) foi expresso pelo valor do IC₅₀ (mg/mL) nos diferentes pesos experimentados. Boga et al., (2011) testaram 8 plantas quanto aos seus efeitos inibitórios de BChE, entre elas estava a rúcula, que demonstrou ser a mais eficiente para inibição da atividade enzimática de BChE. Mas para o estudo o efeito de inibição da atividade de BChE no hepatopâncreas do *L. vannamei* o extrato de rúcula mostrou-se mais eficiente apenas em camarões de 6g (IC₅₀ = 0,019µg/mL), porém essa faixa de peso apresenta menor atividade da BChE (Figura 3).

Acelga

As Figuras 7,8 e 9 demonstram redução da atividade BChE (IC₅₀ de 0,14 a 24,3µg/mL) frente a concentrações crescentes do extrato de acelga (*Beta vulgaris*):

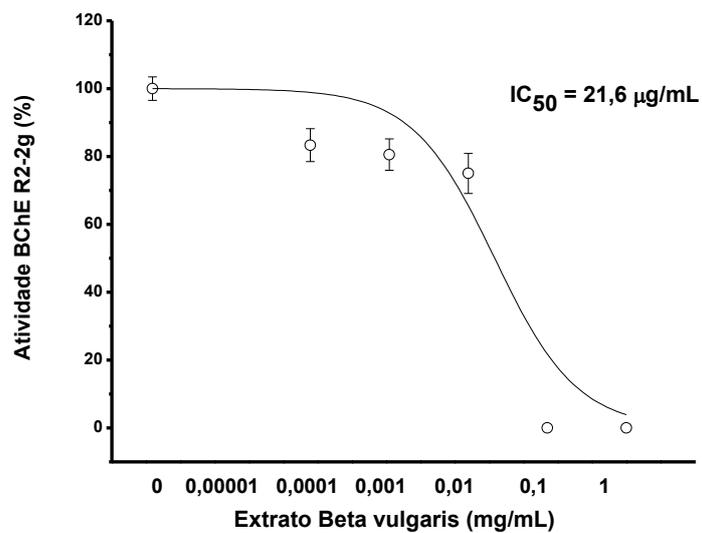


Figura 7 – Efeito do extrato de acelga (*B. vulgaris*) sobre a atividade da BChE em hepatopâncreas de *L. vannamei* de 2 g (n = 10).

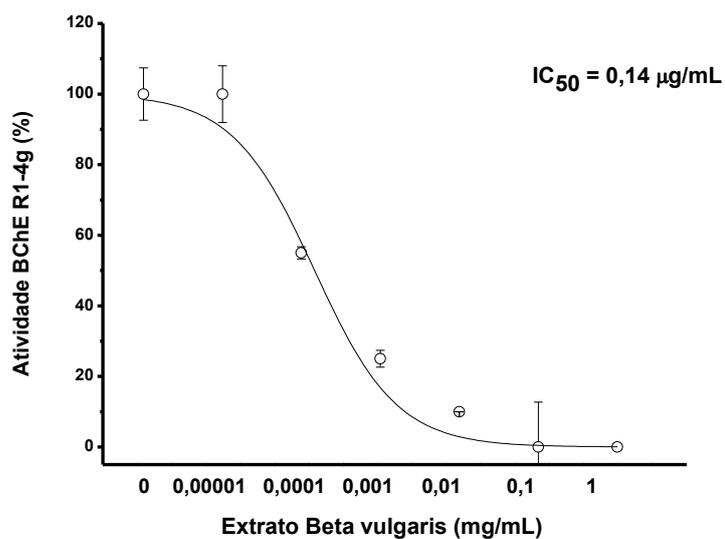


Figura 8 – Efeito do extrato de acelga (*B. vulgaris*) sobre a atividade da BChE em hepatopâncreas de *L. vannamei* de 4 g (n = 10).

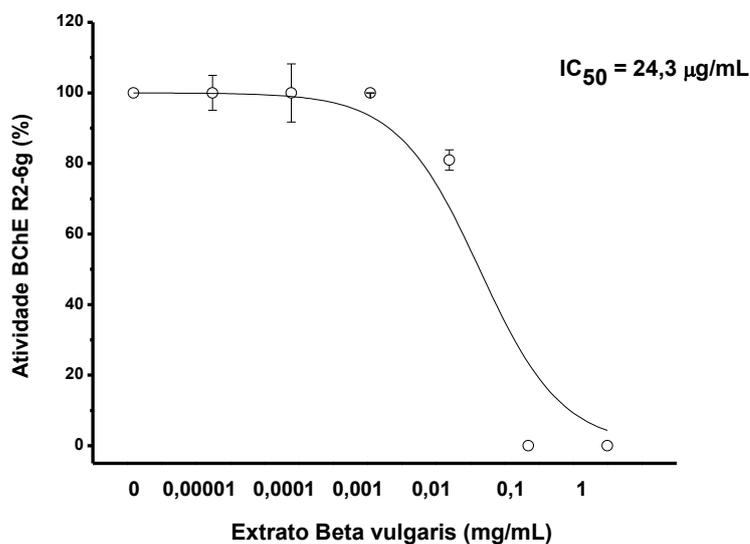


Figura 9 – Efeito do extrato de acelga (*B. vulgaris*) sobre a atividade da BChE em hepatopâncreas de *L. vannamei* de 6 g (n = 10).

O extrato da acelga (*B. vulgaris*) obteve o maior sucesso na inibição da atividade enzimática em camarões de 4g ($IC_{50} = 0,14\mu\text{g/mL}$), quando se comparado aos demais pesos. Nos ensaios de Boga et al., (2011) a acelga não mostrou um efeito inibitório alto frente a BChE, mas o presente estudo mostra que quando comparada com a rúcula, na faixa de peso de 4g, o extrato da acelga conseguiu obter valores mais baixos de IC_{50} .

Espinafre

As Figuras 10, 11 e 12 demonstram redução da atividade BChE (IC_{50} de 0,20 a $1,52\mu\text{g/mL}$) frente a concentrações crescentes do extrato de espinafre (*Spinacea oleracea*):

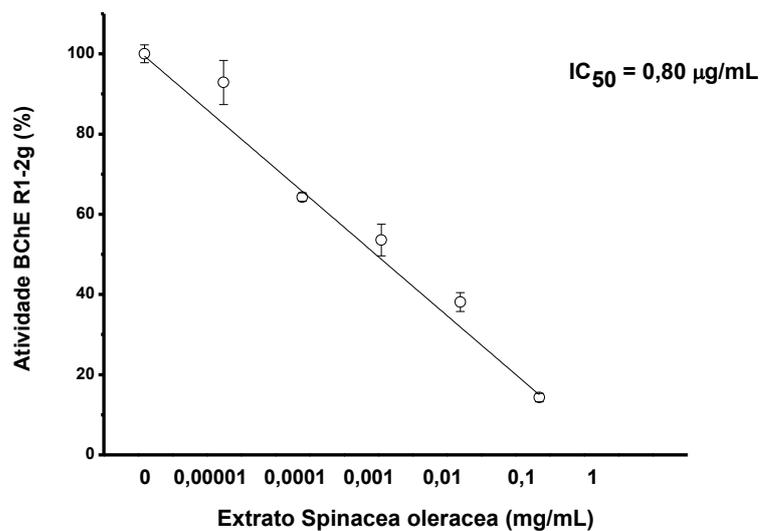


Figura 10 – Efeito do extrato de espinafre (*S. oleracea*) sobre a atividade da BChE em hepatopâncreas de *L. vannamei* de 2 g (n = 10).

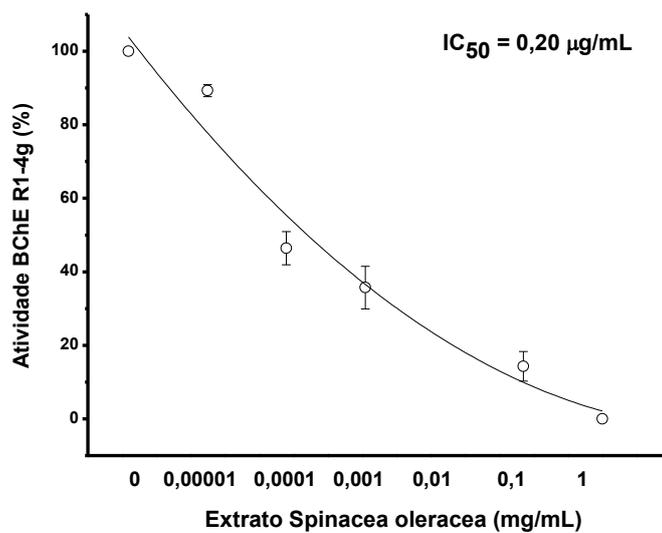


Figura 11 – Efeito do extrato de espinafre (*S. oleracea*) sobre a atividade da BChE em hepatopâncreas de *L. vannamei* de 4 g (n = 10).

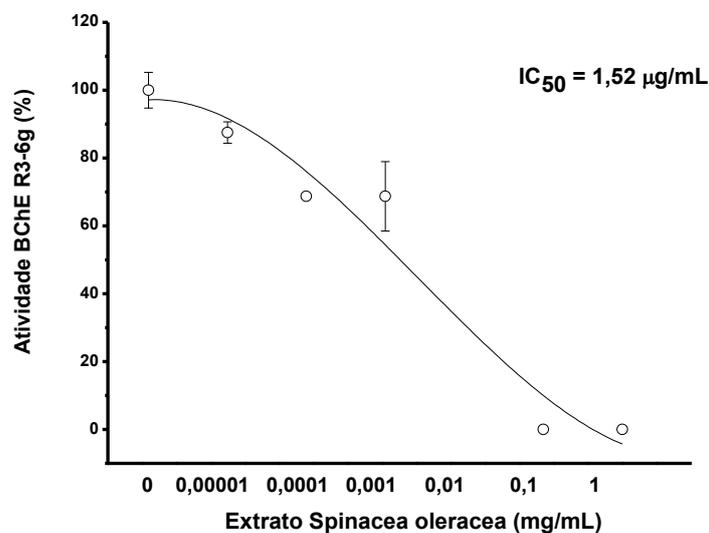


Figura 12 – Efeito do extrato de espinafre (*S. oleracea*) sobre a atividade da BChE em hepatopâncreas de *L. vannamei* de 6 g (n = 10).

Nos ensaios de Boga et al., (2011) o extrato alcoólico de espinafre, em termos percentuais, não foi capaz de inibir mais que 20% da atividade enzimática da BChE, apesar disso, no estudo o extrato de espinafre (*S. oleracea*) demonstrou ser uma boa alternativa para inibição para todas as faixas de peso testadas, excetuando a faixa de 4g onde o maior efeito inibitório obtido foi da acelga.

Na Tabela 2, é possível observar que existe uma tendência de maior efeito inibitório pelos extratos vegetais de acelga e espinafre sobre os camarões do estágio intermediário (4g), já a rúcula apresentou uma maior inibição no maior peso (6g). Pelo fato da atividade de BChE ser maior nas fases iniciais do camarão (Figura 3), sugira-se que em futuros ensaios *in vivo* seja usado camarões na fase intermediária de 4g para o início do fornecimento de rações com inibidores de BChE. Observado isso, o extrato de acelga obteve melhor desempenho nessa faixa de peso e por esse motivo foi o extrato selecionado para a formulação do aditivo incorporado a ração comercial repetizada.

Tabela 2 – Valores de IC₅₀ relativos às inibições exercidas por três extratos vegetais sobre a atividade BChE do hepatopâncreas de *L. vannamei*.

Extrato vegetal Peso camarão	IC ₅₀ (µg/mL)	Extrato vegetal Peso camarão	IC ₅₀ (µg/mL)	Extrato vegetal Peso camarão	IC ₅₀ (µg/mL)
Rúcula cam 2g	2,3	Acelga cam 2g	21,6	Espinafre cam 2g	0,80
Rúcula cam 4g	4,7	Acelga cam 4g	0,14	Espinafre cam 4g	0,20
Rúcula cam 6g	0,019	Acelga cam 6g	24,3	Espinafre cam 6g	1,52

Teste Bromatológico

Os tratamentos foram avaliados em sua composição centesimal (umidade, cinzas, extrato etéreo, proteína bruta, carboidratos totais) de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Médias (± desvio padrão) das análises bromatológicas das rações repetizadas sem aditivo, com aditivo natural (extrato vegetal etanólico de Acelga - *Beta vulgaris* var. *circulata*) e com aditivo sintético (Iso-OMPA).

Variáveis	Tratamentos		
	Controle	Natural	Sintético
Umidade (%)	6,37±0,0	7,99±0,056	5,95±0,070
Cinzas (%)	14,875±0,063	15,705±0,289	15,115±0,162
Extrato Etéreo (%)	7,105±0,007	7,29±0,155	7,04±0,0
Proteína Bruta (%)	45,05±0,014	43,18±0,056	43,76±0,197
Carboidratos Totais (%)	26,60±0,077	26,04±0,155	28,28±0,219

Níveis de garantia da ração comercial: proteína bruta 35%; umidade 13%; extrato etéreo 7,0%; matéria mineral 13%.

As rações repetizadas apresentaram menor umidade em relação a ração comercial não repetizada (Natural: 7,99±0,056%; Sintético: 5,95±0,070% e Controle: 6,37±0,0%), o que pode ter ocorrido devido ao tempo de secagem na estufa, para os demais parâmetros as rações repetizadas não apresentaram níveis desiguais a ração comercial utilizada.

Testes físicos

Os resultados dos testes físicos que garantem a manutenção da qualidade da ração após o processo de repetização podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Médias (\pm desvio padrão) das análises físicas das rações repeletizadas e comercial.

Variáveis	Tratamentos				p-valor
	Controle	Natural	Sintético	Comercial	
IAA (%)	73,387 \pm 0,037 ^a	75,613 \pm 0,016 ^a	74,827 \pm 0,021 ^a	72,64 \pm 0,019 ^a	0.481
F (segundos)	2,33 \pm 0,577 ^a	2 \pm 0,0 ^a	3 \pm 1,732 ^a	2 \pm 0,0 ^a	0.528
IDP (%)	99,733 \pm 0,021 ^a	98,633 \pm 0,119 ^a	98,367 \pm 0,045 ^a	99,4 \pm 0,079 ^a	0.174
IRA (%)	0,855 \pm 0,013 ^a	0,849 \pm 0,025 ^a	0,873 \pm 0,020 ^a	0,888 \pm 0,009 ^a	0.093
DA (mg/ml)	0,473 \pm 0,072 ^a	0,552 \pm 0,029 ^a	0,458 \pm 0,066 ^a	0,311 \pm 0,035 ^b	0.0038

Letras diferentes na linha indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

IAA: Índice de Absorção de Água; F: Flutuabilidade; IDP: Índice de Durabilidade dos Peletes; IRA: Índice de Resistência a Água; DA: Densidade Aparente.

Para o rendimento foram processados 5kg da ração comercial para cada tratamento, obtendo-se um rendimento médio final de aproximadamente 90% para todos os grupos. As rações não demonstraram flutuabilidade, com tempo aproximado de afundamento, o que já é esperado, já que a espécie-alvo tende a permanecer no fundo durante o cultivo facilitando o acesso a ração. Em relação a durabilidade dos peletes dos tratamentos processados, os índices foram próximos aos da ração comercial, mostrando que o processo adotado não interferiu na durabilidade da ração. Os índices de resistência e absorção de água não variou entre os tratamentos e a ração comercial. A densidade aparente entre os tratamentos não apresentou diferença estatística, mas quando se compara com a ração comercial houve diferença, o que pode ser atribuído ao processo de repeletização que deixou os peletes um pouco maiores que os peletes da ração comercial.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, os extratos apresentaram melhores efeito inibitório frente a BChE em fases iniciais dos camarões, o extrato de acelga que apresentou maior efeito inibitório sobre a BChE de camarões no estágio de desenvolvimento com 4g, constituindo-se como a configuração (inibidor x estágio de desenvolvimento) mais promissora para futuros ensaios *in vivo* através de sua adição em rações comerciais como aditivo alimentar. O método de repeletização de ração comercial com a adição do aditivo de extrato de acelga, demonstrou que o mesmo pode ser uma alternativa interessante para ser utilizado durante a fase de engorda com melhor resposta de inibição da BChE, sem prejudicar a qualidade nutricional e física da ração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEY, R.A., BAILEY, S., HEALY, P., CHANG, J., UNGER, T.F., HUDSON, R.A. A butyrylcholinesterase in the early development of the brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: a target for phthalate ester embryotoxicity? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299, 659–662, 2002.

ANDERSON, R. A.; CONWAY, H. F.; PFEIFER, V. F.; GRIFFIN JUNIOR, L. Gelatinization of Corn Grits by Roll-and Extrusion-Cooking. *Cereal Science Today*, St. Paul, v.14, n.1, p. 4-12, 1969.

ASSIS, C.R.D., BEZERRA, R.S., CARVALHO JR., L.B., 2011. Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. In: *Pesticides in modern world – Book 5*. Stoytcheva, M. (Ed). Intech, Rijeka, Croatia.

ASSIS, C. R. D.; LINHARES, A. G.; OLIVEIRA, V. M.; FRANÇA, R. C. P.; SANTOS, J. F.; MARCUSCHI, M.; MACIEL CARVALHO, E. V. M.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO JR., L. B. Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish. *Fish Physiol. Biochem.*, v. 40 (6), p. 1659–1668, 2014.

BALASUBRAMANIAN, A.S., BHANUMATHY, C.D. Noncholinergic functions of cholinesterases. *FASEB J* 7:1354-1358, 1993.

BOGA, M., HACIBEKIROĞLU, I., KOLAK, U. Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven edible plants. *Pharmaceutical Biology*, 49(3): 290–295, 2011.

BRIMIJOIN, S., CHEN, V.P., PANG, Y.P., GENG, L., GAO, Y. Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. *Chemico-Biological Interactions* 259 (2016) 271-275.

CAVALCANTI, L. *Segmento: Carcinicultura*. Recife: Inova Nordeste, 2005.

CHEN, V.P., GAO, Y., GENG, L., BRIMIJOIN, S. Butyrylcholinesterase regulates central ghrelin signaling and has an impact on food intake and glucose homeostasis. *International Journal of Obesity* 1–7, 2017.

DAIRIKI, J. K.; MAJOLO, C.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; OLIVEIRA, M. R. de; MORAIS, I. da S. de. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. Circular técnica. ISSN 1517-2449, Manaus, AM Setembro, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONAL (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture, 2022.

FOX, B.K., BREVES, J.P., HIRANO, T., GRAU, E.G. Effects of short- and long-term fasting on plasma and stomach ghrelin, and the growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Domest. Anim. Endocrinol.* 37, 1–11, 2009.

FRASCO, M.F., ERŽEN, I., STOJAN, J., GUILHERMINO, L. Localization and properties of cholinesterases in the common prawn (*Palaemon serratus*): a kinetic-histochemical study. *Biological Bulletin.* 218, 1-5, 2010.

GENTELINI, A.L.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A.; MEURER, F.; HAYASHI, A. Graus de moagem dos ingredientes em rações peletizadas para alevinos de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences.* Maringá, v. 27, no. 1, p. 93-97, Jan./March, 2005.

GHEDIRA, J., JEBALI, J., BOURAOU, Z., BANNI, M., CHOUBA, L., BOUSSETTA, H. Acute effects of chlorpyrifos-ethyl and secondary treated effluents on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in *Carcinus maenas*. 21, 1467-1472, 2009.

HELUY, G.M., RAMOS, L.R.V., PEDROSA, V.F., Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) como aditivo em dietas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criados em água salinizada. *Aquático Res.* 2020; 51: 3237 – 3243.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da pecuária municipal 2021. *Produção Pecuária Municipal*, v.45, 2021.

JOHNSON, G., MOORE, S.W. Why has butyrylcholinesterase been retained Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochemistry International*, 61, 783–797, 2012.

JÖNSSON, E. The role of ghrelin in energy balance regulation in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 187, 79–85, 2013.

KAIYA, H., MIYAZATO, M., KANGAWA, K. Recent advances in the phylogenetic study of ghrelin. *Peptides* 32, 2155–2174, 2011.

KALEESWARAN B., ILAVENIL S., RAVIKUMAR S. Dietary supplementation with *Cynodon dactylon* (L.) enhances innate immunity and disease resistance of Indian major carp, *Catla catla* (Ham.), *Fish & Shellfish Immunology*, Volume 31, Issue 6, 2011, Pages 953-962,

KAMARUDIN, M.S.; SULAIMAN, M.A.; ISMAIL, M. Effects of dietary crude fiber level on growth performance, body composition, liver glycogen and intestinal short chain fatty acids of a tropical carp (*Barbonymus gonionotus* X *Hypsibarbus wetmorei* male) *Journal of Environmental Biology*, p. 813-820, 2018.

KIM, SANG-BO, YOON, NA YOUNG, LIM, CHI WOON. Antioxidant and Cholinesterase Inhibitory Activities of the By-Products of Three Pandalid Shrimps. *Fisheries and Aquatic Sciences* 17, no. 4 (December 30, 2014): 421–25. doi:10.5657/FAS.2014.0421.

KUMAR, S., BRIJESHLATA, DIXIT, S. Screening of traditional indian spices for inhibitory activity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 3, 59-65, 2012.

MAGALHÃES, M. E. S. Cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone,1931) em sistema multifásico. 2004. 60 f. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MARTÍNEZ, R., CARPIO, Y., ARENAL, A., LUGO, J.M., MORALES, R., MARTÍN, L., RODRÍGUEZ, R.F., ACOSTA, J., MORALES, A., DUCONGE, J., ESTRADA, M.P. Significant improvement of shrimp growth performance by growth hormone-releasing peptide-6 immersion treatments. *Aquaculture Research*. 48, 4632–4645, 2017.

MÉNDEZ-MARTÍNEZ, Y., GUCIĆ, M., MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L.R., CIVERA-CERECEDO, R., RICQUE-MARIE, D., CORTÉS-JACINTO, E. Dry matter, protein, and energy digestibility of diets for juvenile Pacific white leg shrimps (*Litopenaeus vannamei*) reared at different salinity levels. *Ciência Rural*. v.51:8, e20190636, 2021.

MESULAM, M.M., GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY, A., DUYSSEN, E.G., LOCKRIDGE, O. (2002) Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neurosci* 110:627-639.

PARHAR, I.S., SATO, H., SAKUMA, Y. Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 305, 169–75, 2003.

PEZZEMENTI, L.; CHATONNET, A. Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. *Chemico-Biological Interactions*, v. 187, p. 27–33, 2010.

PRESTES, A., G. Dissertação - Granulometria dos ingredientes para uso em dieta extrusada na qualidade física dos péletes e desempenho zootécnico de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Manaus-AM, abril-2021

POLESE, M. F. Efeito da granulometria do milho da ração nos parâmetros zootécnicos e morfométricos em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Tese (Doutor em ciência animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro, março de 2013.

SADO, R.Y. Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). 136 p.

Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SANTOS, D. B.; PONTES, C. S.; FREIRE, F. A. M.; JUNIOR, A. P. B. Efeito do tipo de sedimento na eficiência alimentar, crescimento e sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 33(4): 369-375, 2011.

SANTOS, J.; NUNES, C. A. R.; TAVECHIO W. L. G.; LEDO C. A. S.; MACEDO C. F.; PEREIRA C. M.; SANTOS A. A.; SANTANA I. C. Efeito do pastoreio do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) sobre microrganismos associados a substratos artificiais. *Revista Sertão Sustentavel*, 2(1): 29 – 34, 2020

SEDMAK, J.J., GROSSBERG, S.E., A rapid, sensitive and versatile assay for proteinusing Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* 79 (1–2), 544–552, 1977.

SILMAN, I., SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 293–302, 2005.

TURKAN, F., TASLIMI, P., AND SALTAN, F.Z. Tannic acid as a natural € antioxidant compound: Discovery of a potent metabolic enzyme inhibitor for a new therapeutic approach in diabetes and Alzheimer’s disease. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, e 22340, 2019

UNNIAPPAN, S., PETER, R.E. Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 140, 396–408, 2005.

VIDAL, Maria de Fátima. *Carcinicultura*. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 7, n.222, abr. 2022. (Caderno Setorial)

WATT, B. K., MERRILL, A. L. *Composition of Foods: Raw, Processed, Prepared*. Pg 190-200, 1963.