

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA– PPGZOO**

RAFAELLA ROSSETTO PETROLI

**UTILIZAÇÃO DE FONTES HERBAIS RICAS EM TANINOS HIDROLISÁVEIS E
VITAMINA C PARA TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*):
DESEMPENHO, COMPOSIÇÃO CORPORAL E EFEITOS ANTIOXIDANTES**

CHAPECÓ

2022

RAFAELLA ROSSETTO PETROLI

**UTILIZAÇÃO DE FONTES HERBAIS RICAS EM TANINOS HIDROLISÁVEIS E
VITAMINA C PARA TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*):
DESEMPENHO, COMPOSIÇÃO CORPORAL E EFEITOS ANTIOXIDANTES**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.
Orientador: Prof. Dr. Diogo Luiz de Alcantara Lopes

CHAPECÓ

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Petrolli, Rafaella

UTILIZAÇÃO DE FONTES HERBAIS RICAS EM
TANINOS HIDROLISÁVEIS E VITAMINA C PARA
TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*): DESEMPENHO,
COMPOSIÇÃO CORPORAL E EFEITOS ANTIOXIDANTES /
Rafaella Petrolli. -- 2022.

55 p.

Orientador: Diogo Luiz de Alcantara Lopes
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2022.

1. 2-cetogulonolactona. 2. Extratos herbais. 3.
Galotânicos. 4. Nutrição de peixes. 5. Vitamina C. I. Luiz de
Alcantara Lopes, Diogo . II. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

RAFAELLA ROSSETTO PETROLI

**UTILIZAÇÃO DE FONTES HERBAIS RICAS EM TANINOS HIDROLISÁVEIS E
VITAMINA C PARA TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*):
DESEMPENHO E COMPOSIÇÃO CORPORAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.
Orientador: Prof. Dr. Diogo Luiz de Alcantara Lopes

BANCA EXAMINADORA

Membros:

Prof. Dr. Diogo Luiz de Alcantara Lopes
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Prof^a. Dra. Cintia Labussier Nakayama
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva,
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Chapecó, 31 de agosto de 2022

AGRADECIMENTOS

A Deus pela Vida, pela família, pelas conquistas, pelos desafios, por tudo.

Agradeço ao meu pai Vilmar, pelos ensinamentos da vida, pela determinação, força e coragem.

Ao meu esposo, companheiro de vida, Tiago, por todo o apoio e incentivo durante esta caminhada.

Aos meus filhos Nícolas e Allana pela inspiração e amor, pelo carinho, afeto, e pelo sentido maior na minha vida, permitindo ser a mãe de vocês e receber a missão de guardar, cuidar e amar as joias mais valiosas criadas por Deus.

Aos meus irmãos Rogerio e Rosangela pelo companheirismo e apoio.

Sou grata a meu orientador por aceitar conduzir o meu trabalho de pesquisa sem medir esforços.

A todos os professores da Universidade do Estado de Santa Catarina – Udesc pela excelência na condução de cada aula.

A FAPESC pela bolsa de pesquisa durante todo o período de mestrado.

Aos grupos de trabalho e pesquisa GT-aqua da UDESC e NUPAM da UNOESC, por se dedicarem ao nosso trabalho, por todo auxílio prestado durante a condução do experimento.

Aos demais professores de entidades diferentes que auxiliaram na realização das análises.

Aos meus amigos e colegas, que estavam juntos nessa caminhada, mesmo nesse tempo difícil de pandemia da COVID 19.

“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar o contrário” (Albert Einstein)

RESUMO

Objetivou-se verificar se a adição da combinação dos fitogênicos derivados da Groselha-Indiana (*Emblica officinalis*) e do Manjeriçã-Santo (*Ocimum sanctum*) em dietas de tilápias-do-nilo, ricos em galotaninos e 2-cetogulonolactona, exerce efeitos sobre os parâmetros de desempenho produtivo, efeitos antioxidantes e retenção de cálcio e fósforo corporal. Foram utilizadas 175 tilápias da linhagem GIFT, com comprimento médio de 3 cm e 1,2g de peso corporal, distribuídas no primeiro dia de alojamento em delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo composto por cinco tratamentos, constituídos por cinco repetições, com sete animais em cada repetição. Os peixes foram acondicionados em caixas de polietileno, com capacidade de 100 litros, contendo circulação direta de água, por 90 dias. Os níveis testados foram: Ração basal; Ração basal + 200mg/kg de extratos herbais; Ração basal + 400mg/kg de extratos herbais; Ração basal + 600mg/kg de extratos herbais; Ração basal + 800mg/kg de extratos herbais. As rações foi fornecidas com base no percentual do peso corporal, (6% da biomassa). Para a avaliação do ganho de peso, conversão alimentar e ajustar a quantidade de ração a ser fornecida, todas as tilápias e as rações foram pesadas com um intervalo de 30 dias. Foram avaliados o comprimento e largura corporal e, adicionalmente, uma tilápias por unidade experimental foram eutanasiadas aos 60 dias, e duas aos 90 dias, e realizada coleta de amostras de sangue para parâmetros antioxidantes séricos. Duas carcaças foram coletadas para análise de cálcio e fósforo corporal (uma aos 60 e outra aos 90 dias), juntamente com o esqueleto de um juvenil por unidade experimental (aos 90 dias). Os dados foram submetidos a análise de variância e regressão linear e quadrática, a 0,05 de significância. Houve manutenção do ganho de peso, redução do consumo e tendência de redução na conversão alimentar de forma linear e quadrática. Observou-se redução linear e efeito quadrático na mortalidade dos juvenis, com manutenção dos pesos relativos do fígado e intestino e dos níveis de cálcio corporal. Também, observou-se menor peroxidação lipídica e menores níveis da enzima Glutathione-S-Transferase, mantendo-se os níveis de proteínas séricas totais e da enzima Superóxido-Dismutase. O nível de fósforo corporal aumentou de forma linear conforme aumentou-se o nível dos extratos na alimentação das tilápias. Conclui-se que a adição da combinação fitogênica de *Emblica officinalis* e *Ocimum sanctum* pode

ser utilizada adequadamente na alimentação de tilápias-do-nylo, reduzindo a mortalidade e aumentando a concentração de cálcio e fósforo corporal.

Palavras-chave: 2-cetogulonolactona; Extratos herbais; Galotaninos; Nutrição de peixes; Tilapicultura; Vitamina C.

ABSTRACT

The objective was to verify if the addition of a combination of phytochemicals derived from Amla (*Emblica officinalis*) and Holy Basil (*Ocimum sanctum*) in Nile tilapia diets, rich in gallic acid and 2-ketogulonolactone, has influence on performance, antioxidant system and corporal calcium and phosphorus retention. A total of 175 GIFT tilapia were used, with an average length of 3 cm and 1.2g of body weight, distributed on the first day of housing in a completely randomized design, consisting of five treatments, five replications and seven animals in each repetition. The fish were placed in polyethylene boxes, with a capacity of 100 liters, with direct circulation of water, for 90 days. The levels tested were: Basal ration; Basal ration + 200mg/kg of herbal extracts; Basal ration + 400mg/kg of herbal extracts; Basal ration + 600mg/kg of herbal extracts; Basal ration + 800mg/kg of herbal extracts. The rations were provided based on the percentage of body weight, with provision of 6% of the volume of ration in relation to the body weight. To evaluate weight gain, feed conversion and adjust the amount of feed to be provided, all tilapia and rations were weighed with an interval of 30 days. Body length and width were evaluated and, additionally, one tilapia per experimental unit was euthanized at 60 days, and two at 90 days, and blood samples were collected for antioxidant parameters (oxygen-reactive species - ROS and acid-reactive antibodies). thiobarbiturate - TBARS) and antioxidants (Total antioxidant capacity - TAC and antioxidant power to reduce plasma iron - FRAP) analysis. Two carcasses were collected for calcium and phosphorus analysis (one at 60 and another at 90 days), along with the skeleton of one juvenile per experimental unit (at 90 days). Data were submitted to analysis of variance and linear and quadratic regression, at 0.05 of significance. There was maintenance of weight gain, reduced feed intake and a trend towards reduction in feed conversion in a linear and quadratic form. There was a linear reduction and quadratic effect in juvenile mortality, with maintenance of the relative weights of the liver and intestine and the levels of body calcium. Also, lower lipoperoxidation and Glutathione-S-Transferase levels were found, and no differences in serum total protein and Superoxide-dismutase was observed. The level of body phosphorus increased linearly as the level of extracts in the tilapia feed increased. It is concluded that the addition of the phytochemical combination of *Emblica officinalis* and *Ocimum sanctum* can be used properly in the feeding of Nile tilapia, reducing mortality and increasing the concentration of body calcium and phosphorus.

Keywords: 2-ketogulonolactone; Fish nutrition; Gallotannins; Herbal extracts; Tilapicultura; Vitamin C.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese do ácido ascórbico nos animais	23
Figura 2 – Efeitos linear e quadrático do consumo de ração de peixes alimentados com diferentes níveis de extratos herbais na dieta aos 90 dias de cultivo.....	45
Figura 3 – Efeito linear dos níveis de GST e da lipoperoxidação lipídica aos 90 dias de cultivo de peixes alimentados com diferentes níveis de extratos herbais na dieta.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Passos metabólicos de síntese do ácido ascórbico.....	23
Tabela 2 – Fontes comerciais mais comuns de vitamina C para utilização na dieta de peixes.....	27
Tabela 3 – Tratamentos utilizados.....	39
Tabela 4 – Composição alimentar e nutricional da ração basal experimental.....	40
Tabela 5 – Desempenho de tilápias-do-nilo suplementadas com diferentes níveis de fonte herbal de vitamina C na dieta.....	41
Tabela 6 – Peso relativo de órgãos e índice hepatossomático de tilápias-do-nilo suplementadas com diferentes níveis de fonte herbal de vitamina C na dieta aos 90 dias de cultivo.....	42
Tabela 7– Parâmetros antioxidantes no sangue de tilápias-do-nilo suplementadas com diferentes níveis de fonte herbal de vitamina C na dieta.....	43
Tabela 8 – Mineralização corporal e das vértebras de tilápias-do-nilo suplementadas com diferentes níveis de fonte herbal de vitamina C na dieta.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca	Cálcio
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CA	Conversão alimentar
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe	Ferro
GST	Glutathione-S-Transferase
g	Gramas
L	Litro
MI	Miligramas
LPO	Peroxidação lipídica
P	Fósforo
Udesc	Universidade do Estado de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3	ARTIGO: UTILIZAÇÃO DE ADITIVO FITOGÊNICO A BASE DE GROSELHA-INDIANA (<i>Emblica officinalis</i>) E MANJERICÃO-SANTO (<i>Ocimum sanctum</i>) NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIAS-DO-NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	28
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
	REFERÊNCIAS.....	47
	ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA	54

1 INTRODUÇÃO

Os peixes apresentam incapacidade em sintetizar a vitamina C em seu organismo, sendo uma das poucas espécies de interesse zootécnico que necessitam de suplementação diária desta vitamina. Atualmente, a adição desta vitamina nas rações, oriundas de fontes sintéticas, é a prática mais comum e corriqueira na nutrição de peixes. Adicionalmente, devido ao hábito alimentar nas espécies piscícolas de água doce em capturar o alimento na superfície da água, majoritariamente as rações de peixes são fabricadas através do processo de extrusão, para que as rações possuam menor densidade em relação à água e possam flutuar quando fornecidas aos peixes.

Entretanto, todas as fontes de vitamina C de origem sintética são termolábeis e, como o processo de extrusão frequentemente ultrapassa a temperatura de 110°C de processamento, grande parte do ácido ascórbico presente é destruído, e as rações produzidas acabam não contendo o nível de vitamina C previamente formulado (Rota, 2003). Diante disso, atualmente se faz necessário o desenvolvimento de alguma fonte de vitamina C que possa suportar esta temperatura de processamento, sem sofrer perdas no seu valor biológico. Adicionalmente, a 2-cetogulonolactona é a única molécula que os peixes conseguem transformar em vitamina C a nível hepático, visto que os peixes não possuem a enzima L-gulonolactona oxidase, a qual é responsável pela síntese da 2-cetogulonolactona, que é o último passo antes da síntese de ácido ascórbico no organismo das tilápias. Com isso, a adição desta molécula já disponibiliza o último precursor da vitamina C, garantindo sua conversão.

Os taninos são compostos fenólicos que podem ser encontrados em diversas plantas, podendo estar na forma livre ou agrupados. Atuam no mecanismo de defesa da planta contra ataques de animais e microrganismos patógenos. Taninos podem ser hidrolisáveis por ácidos, bases e enzimas em suas unidades. São divididos em galotaninos, que produz ácido gálico e elagitaninos após sua hidrólise liberam ácido elágico.

Historicamente, os taninos foram conhecidos pelos seus efeitos antinutricionais, devido a complexação com a proteína a nível intestinal, juntamente com seu efeito adstringente na palatabilidade, situações que limitam o consumo de alimento e o desempenho dos peixes. Entretanto, sua recente

utilização, em nível de “aditivo”, tem demonstrado efeitos benéficos na taxa de sobrevivência e no status geral de saúde dos peixes, em virtude de seus efeitos antioxidantes.

Uma nova fonte, com promissora utilização na alimentação de peixes baseia-se em uma mistura de extratos herbais composta pela Groselha-Indiana (*Emblica officinalis*) e Manjericão-Santo (*Ocimum sanctum*), os quais são ricos em taninos hidrolisáveis (galotaninos) e em 2-cetogulonolactona, molécula precursora do ácido ascórbico no organismo dos peixes, estando em uma forma termoestável, que pode ser submetida ao processo de extrusão sem que haja perda no valor biológico desta molécula, a qual pode contribuir para o suprimento das exigências de vitamina C no organismo dos peixes. Estes elementos podem exercer efeitos antioxidantes a nível metabólico, tornando-se opção para a utilização na alimentação dos peixes.

Entretanto, estudos ainda são escassos a respeito desta fonte na nutrição de peixes, e nada foi feito ainda relacionada à nutrição de tilápias-do-nylo. Como a tilápia compreende a principal espécie produtiva no Brasil, estudos que permitam o desenvolvimento de novas alternativas e novas tecnologias para este setor são imprescindíveis para o desenvolvimento desta cadeia produtiva.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Groselha-Indiana (*Emblica officinalis* ou *Phyllanthus emblica*)

A Groselha indiana, também conhecida como, Emblica, amla ou aonla, é uma árvore de folha caduca da família Phyllanthaceae. Esta espécie vegetal pode ser identificada por dois nomes científicos, os quais estão descrevendo a mesma espécie (Ingale et al., 2016). Nativa de regiões tropicais da Índia e Sudeste Asiático (Parveen e Khatkar, 2015), seus frutos são carnudos, redondos, atraentes para pássaros, profundamente nervurados e de cor verde amarelada (Sonkar et al., 2020), tendo seis sulcos perpendiculares vagos envolvendo suas sementes (Parveen e Khatkar, 2015). A Índia produziu 972 mil toneladas de Groselha-Indiana em 2015-2016 (Tewari et al., 2019). A fruta da Groselha-Indiana é a segunda fonte mais rica em vitamina C entre frutos, após a cereja de Barbados (*Malpighia glabra* L.) (Singh et al. 2006), sendo também excelente fonte de aminoácidos e minerais juntamente com alguns fitoquímicos, como polifenóis, taninos, emblicol, ácido linoleico, corilagina, phyllembin e rutin (Murthy e Joshi 2007; Baliga e D'souza 2011). A fruta é muito utilizada no combate a diabetes, inflamação, aterosclerose, acidez, asma, doenças de pele, problemas digestivos gerais, hepatoprotetora e antitumoral (Parveen e Kahktar, 2015). Também é relatado que a Groselha-Indiana possui atividades hipoglicemiantes, hipolipidêmicas e antimicrobianas (Kumar et al. 2013).

Esta cultivar possui seus principais compostos fenólicos representados por galotaninos, junto com vitamina C em sua composição (Sonkar et al., 2020). Tewari et al. (2019) relataram que existem diferentes cultivares desta espécie com potencial de fornecimento de compostos fenólicos e ácido ascórbico, sendo os frutos da planta a principal matéria-prima para o seu processamento. Estes autores verificaram a presença de em torno de 28% de polifenóis e acima de 500mg/100g de vitamina C neste material, enquanto que Baliga e D'souza (2011) descrevem conteúdo de vitamina C variando entre 300 e 900mg/100g de produto. Parveen e Khatkar (2015) encontraram média de 28% de presença de polifenóis em sua composição, juntamente com 280mg/100g de vitamina C.

Já existem cultivos comerciais desta espécie, inclusive com cultivares melhoradas (Ingale et al., 2016). A fruta possui sabor adstringente, no entanto é

utilizada inclusive na culinária humana (Parveen e Khatkar, 2015). Phochantachinda et al., (2021) relatam a possibilidade de efeito supressor de inflamações neurológicas, cujo extrato etanólico da fruta pode ser um potencial inibidor e modulador de doenças ligadas à degeneração nervosa.

Alguns estudos em organismos aquáticos existem na literatura, relatando alguns efeitos da utilização deste fitogênico na alimentação, cuja maioria deles relatam efeitos mitigadores de estresse, desafio sanitário ou metabólico. D'Souza e Muralidhar (2019) verificaram menor taxa de mortalidade em peixes-zebra submetidos a estresse por altos níveis de amônia na água, ao utilizar um blend contendo Groselha-Indiana em sua composição. Sinha e Jindal (2019) constataram redução nos efeitos metabólicos tóxicos em carpas húngaras (*Cyprinus carpio*) experimentalmente intoxicadas com trimetilamina. Jindal e Sinha (2019) encontraram efeitos mitigadores de problemas de córnea em carpas com lesões induzidas por verde malaquita. Sinha et al. (2021) verificaram redução em efeitos nefrotóxicos em carpas desafiadas com verde malaquita e suplementadas com o extrato da fruta da Groselha-Indiana. Tamta e Saxena (2018) observaram melhora dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos de carpas indianas (*Labeo rohita*) que receberam o extrato via ração.

Paul et al., (2020) encontraram efeito antimicrobiano in vitro sobre *Aeromonas hydrophila* ao utilizar o extrato das folhas de Groselha-Indiana. Srivastava et al. (2019) encontraram melhor desempenho zootécnico em juvenis de carpas indianas alimentadas com rações contendo o extrato da fruta. Chandrakala e Rajeswari (2019) identificaram atividade in vitro da utilização da combinação dos extratos de Groselha-Indiana e Manjericão-santo contra bactérias do gênero *Vibrio* isoladas de Camarão-tigre-gigante (*Penaeus mondon* (Fab.)). Van Doan et al., (2021) encontraram melhor desempenho, produção de muco na pele e resistência antimicrobiana contra *Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-nilo suplementadas com Groselha-Indiana em sistema de bioflocos.

Manjericão-Santo (*Ocimum sanctum*)

O manjericão-santo é uma espécie de arbusto perene, com altura média de 30-60cm, com caules e folhas contendo estruturas semelhantes a pelos (Singh e Chaudhuri, 2018). Chaudhary et al. (2020) relatam que a folha é o

principal componente utilizado na fabricação dos extratos fitogênicos desta planta, ou mesmo para a extração do óleo essencial da mesma. Esta espécie é aromática, nativa da Índia, oriente médio e países da Oceania (Kumar et al., 2022). Os mesmos autores destacam relatos para atividades antidiabética, cicatrizante, antioxidante, protetora de radiação, imunomoduladora, antifertilidade, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiestresse e anticancerígena do extrato desta espécie.

A composição química do Manjeriço-santo é altamente complexa, contendo muitos nutrientes e outros biologicamente ativos. Estes compostos podem variar consideravelmente entre cultivares e até mesmo entre as plantas dentro de uma mesma plantação (Chaudhary et al., 2020). Os principais componentes fitogênicos secundários presentes são o linalool, carophileno, eugenol, o euginal, ácido urosólico, carvacrol, ácido oleanólico, limatrol, antocianinas, ácido rosmalínico e taninos (Borah e Biswas, 2018; Sethi e Badra, 2020; Kumar et al., 2022). Os mesmos autores ainda relatam que, graças a estes componentes, o extrato desta planta confere efeitos antioxidantes (ácido rosmalínico), antibacteriano (carvacrol), adaptogênico (eugenol e carophileno) e imunomodulador, graças à sinergia de todos eles. Kumar et al. (2022) elaborou uma revisão compreendendo uma série de relatos de efeitos da utilização do manjeriço-santo em situações de ocorrência de úlcera gástrica e problemas respiratórios, além de ser potencial molécula anticarcinogênica, antidiabética e para problemas oculares.

Alguns poucos estudos na aquicultura estão disponíveis na literatura científica mundial. Sikotariya e Yusufzai (2019) encontraram melhora no ganho de peso e na taxa de sobrevivência de juvenis de Carpa-branca (*Cirrhinus mrigala*) suplementados com extrato de Manjeriço-santo. Melhor taxa de sobrevivência em Panga (*Pangasianodon hypophthalmus*) infectados com *Aeromonas hydrophila* e suplementados com extrato de manjeriço-santo foi reportado por Saha et al. (2021). Tirkey and Thakur (2018) descreveram efeito antitóxico da utilização do extrato desta planta em peixe cabeça-de-cobra-manchada (*Channa punctatus*) intoxicados com o inseticida Espiromesifeno. Para tilápias-do-nilo, Efendi et al. (2016) descrevem efeito da utilização do extrato de folhas de Manjeriço-santo durante o transporte, anestesiando os peixes em uma concentração de 20%.

Taninos Hidrolisáveis

Os taninos são moléculas classificadas dentro do grupo dos compostos fenólicos, os quais são elementos que ocorrem em muitos organismos vegetais (Whitley et al., 2003), com atividade biológica em potencial para utilização nos organismos animais. Esta molécula já foi encontrada em chás, uvas, vinhos, castanhas, casca de carvalho e frutas como pequi, jabuticaba, manga e romã (Locatelli et al., 2013). Os taninos compreendem um vasto grupo de metabólitos secundários das plantas, solúveis em água, sendo o quarto composto mais abundante no tecido vascular da planta, após celulose, hemi-celulose e lignina (Bule et al., 2020). Um quinto do teor de peso seco das plantas pode ser de taninos, embora possa haver variação na quantidade em relação às condições ambientais (Adamczyk e Simon, 2017).

Historicamente, os taninos foram divididos em dois grupos principais, os hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por múltiplos ésteres de ácido gálico com glicose (galotaninos) ou com outros compostos fenólicos, como os elagitaninos. Os taninos hidrolisáveis (encontrados em algumas dicotiledôneas) são mais raros na natureza quando comparados com os taninos condensados, muito mais abundantes (Fraga-Corral et al., 2020). Os taninos hidrolisáveis podem ser quebrados facilmente, liberando ácido gálico ou elágico, como produto da hidrólise destas moléculas, enquanto que os taninos condensados não podem ser hidrolisados (Bule et al., 2020).

Alimentos ricos em tanino têm potencial antioxidante, atividade anticarcinogênica e também reduzem o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, embora seu consumo iniba a biodisponibilidade do ferro (Kitunen et al., 2017). A interação dos taninos com as proteínas da saliva diminui a lubricidade da saliva, resultando em sensação de desidratação e aspereza por causar contração do tecido epitelial da língua, sendo este fenômeno conhecido como convergência ou adstringência. O estudo da adstringência de frutas tem obtido considerável atenção, uma vez que substâncias adstringentes possuem atividade biológica antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, antialérgica, hepatoprotetora, vasodilatadora e antitrombótica (He et al., 2015). Maisak et al. (2013) relatam que os mecanismos inibitórios dos

taninos sobre o crescimento microbiano são explicados pela inibição direta causada pela interação das moléculas com membranas, paredes celulares e/ou proteínas extracelulares, interferindo no metabolismo normal da bactéria, descrevendo ainda que os taninos hidrolisáveis possuem efeito antimicrobiano superior aos taninos condensados. Zu et al. (2021) observaram melhora no desempenho, na capacidade antioxidante e efeitos sobre a modulação microbiana intestinal de camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) suplementados com 0,15% de taninos hidrolisáveis na alimentação.

Estruturalmente, os taninos hidrolisáveis possuem grupos OH⁻ reativos, os quais podem formar complexos com as proteínas, enzimas e polímeros como a celulose ou hemicelulose (Ncube e Van Staden, 2015), os quais prejudicam de forma substancial sua digestibilidade (principalmente da fração proteica da dieta) e a capacidade de absorção pelo trato digestivo dos animais. Pinto et al. (2000) relataram que a presença de até 0,42% de taninos na dieta de tilápias não prejudica a digestibilidade da matéria-seca e de outros nutrientes. No entanto, a partir de 0,63% de inclusão destes compostos tem impacto negativo sobre a digestibilidade dos nutrientes.

Ácido Gálico

Compostos fenólicos são derivados do metabolismo secundário de plantas, sendo a maior parte derivada do metabolismo da glicose por diferentes reações bioquímicas, que constituem a via do ácido chiquímico (Kahkonen et al., 1999), e por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, possuem propriedades antioxidantes e influência em outros sistemas biológicos no organismo.

Os galotaninos, que compreendem polímeros de ácido gálico ou ainda galatos, compreendem um grupo molecular pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis (King e Young, 1999). Muitas moléculas fitogênicas atualmente estão sendo utilizadas na alimentação animal com efeitos antioxidantes, inclusive podendo substituir algumas funções metabólicas exercidas pela vitamina C no organismo dos peixes. Já existem na literatura (Kim et al. 2002 e Kim e Lee, 2004) metodologias de avaliação dos efeitos antioxidantes das moléculas em comparação a vitamina C, sendo mensuradas como “capacidade

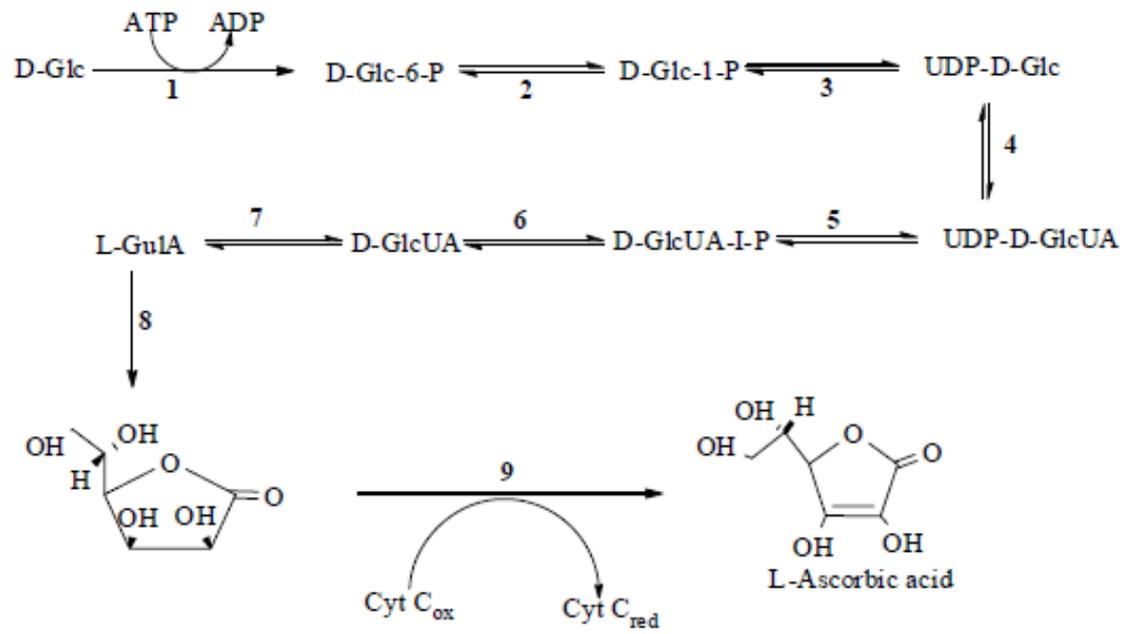
antioxidante equivalente a vitamina C”, do inglês “*Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC)*”. Nestes estudos, os galotaninos estão sendo contemplados, destacando seu efeito como substituinte da vitamina C em algumas funções metabólicas do organismo. Outros efeitos do ácido gálico têm sido reportados na literatura, como anti-inflamatório, antimicrobiano, antifúngico e anticarcinogênico (Fernandes e Salgado, 2016).

Caracterização e metabolismo do Ácido ascórbico (Vitamina C) nos peixes

A vitamina C é um composto hidrossolúvel e termolábil, e sua forma ativa é o ácido ascórbico, que pode estar na forma reduzida ou oxidada, o ácido dehidroascórbico (Reddy, 2018). A forma oxidada pode sofrer outra oxidação, se convertendo na forma inativa, denominada ácido dicetogulônico, evento que pode ser acelerado pela luz e calor. Este fato faz da vitamina C a mais instável das vitaminas.

A vitamina C (Figura 1) é sintetizada pelas plantas e pela maioria dos animais, através da utilização de D-glicose como molécula precursora (Tabela 1), por ter seis carbonos em sua cadeia carbônica e um custo metabólico relativamente baixo (Crawford, 1982). Entretanto algumas espécies, como primatas, cobaia, peixes, morcegos frutívoros, insetos (Gonzáles e Silva, 2019) e algumas aves (principalmente durante estresse térmico) não conseguem sintetizar de forma natural, devido a deficiência da enzima L-gulonolactona desidrogenase (Falcon et al., 2007; Neu et al., 2010), que converte L-gulonolactona em 2-ceto-gulonato (penúltimo passo metabólico da transformação de glicose em ácido ascórbico), composto que se transforma por isomerização espontânea em ácido L-ascórbico. Animais domésticos não necessitam de suplementação de vitamina C, pois esta já é sintetizada em quantidade suficiente para atender suas exigências, no entanto, a falta da enzima determina a necessidade de suplementação nas espécies que não a possuem.

Figura 1 - Síntese do ácido ascórbico nos animais



Fonte: Tripathi et al., 2009

Tabela 1 - Passos metabólicos de síntese do ácido ascórbico.

<i>Passo catalítico</i>	<i>Enzima</i>	<i>Substrato</i>
1	<i>Hexoquinase</i>	<i>D-Glicose</i>
2	<i>Fosfoglicomutase</i>	<i>D-Glicose-6-fosfato</i>
3	<i>UDP-D-Glucose pirofosforilase</i>	<i>D-Glicose-1-fosfato</i>
4	<i>UDP-D-Glucose desidrogenase</i>	<i>UDP-D-Glicose</i>
5	<i>D-glicuronato-1- fosfatase</i>	<i>UDP-D-ácido glicurônico</i>
6	<i>D-Glicurono-quinase</i>	<i>UDP-D-Ácido glicurônico-1-fosfato</i>
7	<i>D-Glicuronato redutase</i>	<i>D-Ácido glicurônico</i>
8	<i>Aldonolactonase</i>	<i>L-Ácido galacturônico</i>
9	<i>L-Gulono-1,4-lactona desidrogenase</i>	<i>L-Gulono-1,4-lactona</i>
10	<i>L-Gulonolactona oxidase</i>	<i>2-cetogulonolactona</i>
11		<i>Ácido ascórbico</i>

Fonte: Tripathi et al., 2009.

A vitamina C desempenha algumas funções importantes no organismo entre elas está o seu envolvimento na síntese de colágeno (Dabrowski et al., 2004; Falcon et al., 2007; Singh et al., 2019), conferindo maior resistência a fibra muscular, onde também obtém papel importante na cicatrização de ferimentos e fraturas, além de ter função importante na formação do esqueleto (Neu et al., 2010) e construção de matriz óssea (Dabrowski et al., 2004). Halver (1972) detectaram presença de ácido ascórbico na pele, barbatana caudal, cabeça, mandíbula, cartilagem de brânquias e áreas de colágeno do osso em peixes, comprovando sua presença em locais de formação de cartilagem. Dabrowski et al., (2004), Sarmiento et al., (2018) e Gonzáles e Silva (2019) destacam que a vitamina C tem papel distinto como cofator para enzimas envolvidas em hidroxilação de prolina e lisina, para produzir hidroxil-lisina e hidroxil-prolina, as quais são necessárias na síntese do colágeno, sendo essencial tanto para a

manutenção normal do tecido conectivo, como para recompor tecidos danificados, devido a isso participando na cicatrização de feridas e fraturas. Os requerimentos de vitamina C nesses processos tem a ver com um efeito protetor da hidroxilase, através da oxidoredução de núcleos de Fe e grupos tiol presentes na enzima.

A vitamina C participa no metabolismo do ferro, transformando-o do estado férrico para o estado ferroso, ainda atua facilitando a absorção do Fe da dieta no intestino (González e Silva, 2019). Isso ocorre devido ao seu efeito protetor de hidroxilase através da oxido redução de núcleos de Fe. O estado ferroso (Fe^{2+}) do Fe mantém-se ligado a enzima por intermédio da vit C, facilitando sua absorção no intestino.

Adicionalmente, participa da síntese de carnitina a partir da lisina e metionina. Atua ainda na conversão do ácido fólico para folínico e pode minimizar a ação de radicais livres, evitando a desestabilização da membrana lipídica (Lehninger et al., 1995; Chien & Hwang, 2001; Falcon et al., 2007).

O ácido ascórbico tem a capacidade de ceder e receber elétrons, o que lhe confere um papel essencial como antioxidante (Hajirezaee et al., 2019; Harsij et al., 2020), estabilizando as células mediante a proteção dos lipídeos das membranas, evitando sua peroxidação pelos radicais livres (González e Silva, 2019). Assim, o ácido ascórbico torna-se essencial na resposta imune do organismo (Han et al., 2019). A defesa antioxidante é um sistema multicomponente com enzimas e outros elementos não-enzimáticos, e micronutrientes como a vitamina C contribuem para esse sistema e estão sendo usados mais amplamente em alimentos para animais. A vitamina C é um antioxidante solúvel em água que é capaz de eliminar os radicais livres, principalmente ROS (Han et al., 2019) e participa da reciclagem de outra vitamina antioxidante, a vitamina E (Dabrowski, 2004). Além disso, indicadores de resposta imune são estimuladas pelos níveis de vitamina C muito acima das necessidades fisiológicas do corpo, protegendo os peixes também contra o estresse (Trichet et al., 2015). Khara et al. (2016) e Reddy (2018) encontraram melhora nos parâmetros hematológicos e no desempenho de peixes suplementados com ácido ascórbico na dieta, dados que sugerem efeito benéfico da vitamina C também sobre o metabolismo sanguíneo.

Deficiência e toxicidade

Gonzáles e Silva (2019) relataram que em geral, altas doses de vitamina C são bem toleradas, não havendo descrição de efeitos tóxicos na literatura (Darias et al., 2011). Como a vitamina C melhora a absorção intestinal de Fe, pode ocorrer acúmulo de Fe (hemocromatose), que afeta a função hepática. A deficiência de ácido ascórbico causa deformação dos tecidos esqueléticos e cartilagosos, fragilidade capilar, reparo lento de feridas, imunidade deprimida, taxa de crescimento reduzida e aumento da taxa de mortalidade (Halver et al., 1975). Ainda, deficiências geram redução no ganho de peso, baixa taxa de sobrevivência e alta incidência de escoliose, lordose e despigmentação em bagre-do-canal (Wilson e Poe, 1973), granulomas de pele devido ao aumento no catabolismo da tirosina (Ruiz et al., 2019), perda de apetite, conversão alimentar prejudicada, deformidades esqueléticas (lordose - curvatura da coluna vertebral de convexidade anterior; escoliose -desvio da coluna vertebral para um lado; e cifose - curvatura da coluna vertebral de convexidade posterior) (Rotta, 2003). Darias et al., (2011) encontraram, em juvenis de tilápias e outros peixes escorbúuticos, escoliose distorcida/filamentos branquiais torcidos, deformações de opérculos e boca.

Exigência de vitamina C para peixes

O sistema de cultivo e o hábito alimentar dos peixes influenciam a necessidade de suplementação de vitamina. É recomendado suplementação em níveis maiores da exigência, para proporcionar aos peixes desempenho normal visando maior resistência a doenças (Falcon et al., 2017). As exigências nutricionais de vitamina C pelos peixes podem ser influenciadas por alguns fatores, entre eles a idade, tamanho, estado reprodutivo e estresse (Neu et al., 2010)

Alterações metabólicas durante situações desfavoráveis geram redistribuição e maior demanda por vitaminas, especialmente a vitamina C (Wedemeyer, 1969). Recomenda-se suplementação em níveis superiores ao necessário para proporcionar aos peixes desempenho normal visando maior resistência a doenças (Li & Lovell, 1985). Peixes com alta concentração de ácido

ascórbico nos tecidos apresentam maior tolerância à poluição ambiental e maior resistência a infecções por bactérias (Navarre & Halver, 1989).

A concentração de vitamina C no fígado é proporcional à concentração na dieta, porém, em virtude da capacidade de reserva desse órgão, existe um limite de armazenamento hepático desta vitamina (Falcon et al., 2007), o que faz com que haja a necessidade de ingestão diária da vitamina pelos peixes. Os referidos autores constataram limite de armazenamento de ácido ascórbico no fígado a partir dos níveis dietéticos de 600mg/kg.

Bloom e Dabrowsky (1996) destacaram a necessidade de haver uma adequada suplementação de vitamina C para peixes reprodutores, e que há uma relação direta entre o aporte de vitamina C na dieta e desempenho, imunidade e taxa de mortalidade da progênie. Os mesmos autores ainda destacam que a vitamina C é importante para o desenvolvimento embrionário e o crescimento na fase inicial da vida das pós-larvas. Na Tabela 2, estão descritas as principais fontes de vitamina C para alimentação animal.

Tabela 2 - Fontes comerciais mais comuns de vitamina C para utilização na dieta de peixes

Forma de apresentação	Tipos disponíveis
Pura	Cristalina Sal sódico
Protegida	Lípídeo/Glicerídeo Etilcelulose Polímero sintético
Estabilizada	6-Palmitato 2-Sulfato 2-Monofosfato 2-Monofosfato Sal Sódico 2-Monofosfato Sal magnésiano 2-Polifosfato

Fonte: Adaptado de Rotta, 2003.

3 ARTIGO: Utilização de aditivo fitogênico a base de Groselha-Indiana (*Embllica officinalis*) e Manjeriçã-santo (*Ocimum sanctum*) na alimentação de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo a ser submetido, com as seções de acordo com as orientações da Revista Aquaculture.

Rafaella Rossetto Petrolli¹, Diogo Luiz de Alcantara Lopes¹

¹Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

3.1 INTRODUÇÃO

A tilapicultura é um campo da piscicultura que necessita de desenvolvimento de tecnologias e de aditivos que possam aumentar a produtividade, melhorando o desempenho dos peixes nos sistemas produtivos, com garantia de saúde e do status antioxidativo dos animais. Neste contexto, a utilização de fontes de taninos hidrolisáveis tem se mostrado promissora (Xhu et al., 2021), pois confere efeito antioxidante e melhorador de desempenho nos organismos aquáticos.

Os gallotaninos compreendem um subgrupo dos taninos hidrolisáveis (Yoshida, et al., 2010), os quais, após sua hidrólise, liberam ácido gálico. Relatos na literatura comprovam que este grupo de moléculas possui efeito positivo nos parâmetros imunológicos (Prusty et al., 2007), efeito antioxidante (Zhu et al., 2021), anti-inflamatório e antimicrobiano (Maisak et al., 2013), o que confere a estas moléculas potencial de melhoria de desempenho zootécnico, as quais devem ser melhor exploradas da tilapicultura.

Entretanto, existe controvérsia na literatura quando aos efeitos produtivos dos taninos hidrolisáveis na aquicultura. Alguns trabalhos demonstram efeitos benéficos de sua utilização (Novriadi et al., 2021; Zhu et al., 2021), enquanto Yao et al. (2019) descrevem haver impacto negativo na digestibilidade das frações

proteica e lipídica da dieta, prejudicando desempenho, e Buyukcapar et al (2011) encontraram redução no crescimento de tilápias suplementadas com altos níveis de taninos hidrolisáveis na dieta. Diante do exposto, mais trabalhos são necessários, principalmente no contexto de definição de dose de segurança de utilização destes elementos na nutrição dos peixes.

Outro desafio presente na tilapicultura consiste na incapacidade em sintetizar a vitamina C (ácido ascórbico) em seu organismo, sendo uma espécie de interesse zootécnico que necessita de suplementação diária desta vitamina, e a adição de fontes sintéticas desta vitamina nas rações é a prática mais comum. Devido ao hábito alimentar nas espécies piscícolas de água doce em capturar o alimento na superfície da água, majoritariamente as rações de peixes são fabricadas através do processo de extrusão, para que as rações possuam menor densidade em relação à água e possam flutuar sobre a lâmina da mesma quando fornecidas aos peixes. As fontes de vitamina C de origem sintética são termolábeis e, como o processo de extrusão frequentemente ultrapassa a temperatura de 110°C de processamento, grande parte do ácido ascórbico presente é destruído, e as rações produzidas acabam não contendo o nível de vitamina C previamente formulado (Rota, 2003). Diante disso, atualmente se faz necessário o desenvolvimento de fontes alternativas de vitamina C que possa suportar esta temperatura de processamento, sem sofrer perdas no seu valor biológico.

Uma nova fonte, com promissora utilização na alimentação de peixes, baseia-se em uma mistura dos extratos herbais oriundos das espécies *Emblica* (*Emblica officinalis*) e Manjerição-santo (*Ocimum sanctum*), os quais são ricos em taninos hidrolisáveis (galotaninos) e em 2-cetogulonolactona, uma molécula precursora do ácido ascórbico no metabolismo hepático dos peixes, sendo uma fonte termoestável que pode ser submetida ao processo de extrusão sem que haja perda no valor biológico, podendo contribuir com o atendimento das exigências de vitamina C no organismo das tilápias.

Adicionalmente, a 2-cetogulonolactona é a única molécula que os peixes conseguem transformar em vitamina C a nível hepático, visto que os peixes não possuem a enzima L-gulonolactona oxidase (Dabrowski, 1990; Shanaka et al., 2021), a qual é responsável pela síntese da 2-cetogulonolactona (Naidu, 2003), que é o último passo antes da síntese de ácido ascórbico no organismo das tilápias (por isso que, naturalmente, não conseguem sintetizar vitamina C). Com

isso, a adição desta molécula já disponibiliza o último precursor da vitamina C, garantindo que haja a conversão final e disponibilidade metabólica desta molécula.

Entretanto, estudos ainda são escassos a respeito desta fonte na nutrição de peixes, e não existem trabalhos relacionados à nutrição de tilápias-do-nilo. Como a tilápia compreende uma das principais espécies de interesse econômico mundial, estudos que permitam o desenvolvimento de novas alternativas e novas tecnologias para este setor são imprescindíveis para o desenvolvimento desta cadeia produtiva.

Diante disso, objetivou-se avaliar se a adição de diferentes níveis de uma combinação dos extratos herbais de Emblica e Manjeriço-Santo, em dietas de tilápias-do-nilo, exerce efeitos sobre os parâmetros de desempenho produtivo, desenvolvimento de órgãos, parâmetros oxidativos, antioxidantes e mineralização óssea.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Animais, tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi conduzido nas instalações do setor de piscicultura da UNOESC Xanxerê, sendo utilizadas 175 tilápias, da linhagem GIFT, com peso médio inicial de 1,2g e comprimento médio de 3cm, em um período experimental de 90 dias de cultivo. O protocolo de pesquisa foi previamente enviado para a comissão de ética no uso de animais (CEUA/UNOESC), aprovado sob parecer n. 14/2021. A estrutura experimental era composta por 25 caixas de polietileno, com volume de 100 litros cada, em sistema de circulação independente (não havia recirculação de água), com água oriunda de poço artesiano, com temperatura, oxigênio dissolvido e pH monitorados diariamente. Durante todo o período experimental, a temperatura média foi de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, os níveis de oxigênio dissolvido foram de $7,8\text{mg/L} \pm 0,9\text{mg/L}$ e o pH esteve na faixa de $7,8 \pm 0,4$.

Os juvenis de tilápias foram distribuídos no primeiro dia alojamento em delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo composto por cinco tratamentos, constituídos por cinco repetições, abrangendo sete peixes em cada

repetição. Foi elaborada uma ração basal, sem qualquer adição de fontes de vitamina C via premix, e os tratamentos foram ajustados conforme a inclusão das fontes descritas na Tabela 3, com rações (Tabela 4) sendo fornecidas com base na saciedade aparente diária.

Os níveis do aditivo fitogênico adicionados nas rações foram crescentes, oriundos de uma fonte herbal composta pela combinação de Emblica (*Emblica officinalis*) e Manjeriçã-santo (*Ocimum sanctum*) (Herbo-C® Powder, Indian Herbs, Saharampur, Índia), a qual contém 12% de taninos hidrolisáveis, 5,0% de ácido gálico e 0,96% de 2-cetogulonolactona, molécula precursora do ácido ascórbico no fígado dos peixes, sendo considerada a mesma contribuição numérica da vitamina C no blend.

Avaliação do desempenho zootécnico das tilápias-do-nilo

Os peixes foram pesados no início do experimento e posteriormente aos 30, 60 e 90 dias de cultivo, juntamente com as sobras de ração, para determinação do ganho de peso, consumo de ração e da conversão alimentar. Também foi monitorada a mortalidade em cada uma das fases avaliadas, sendo calculada em percentual ao total de juvenis alojados.

Aos 60 dias de cultivo, uma tilápia por unidade experimental foi eutanasiada, e aos 90 dias de cultivo, outros dois peixes foram eutanasiados, para coleta de sangue (60 dias) e análise de cálcio e fósforo total corporal (60 e 90 dias) e das vértebras (90 dias). Os peixes foram pesados com auxílio de luvas e toalhas úmidas, com posterior eutanásia em eugenol, (300mg/L) por 60 segundos e imediata secção medular, conforme descrito nas diretrizes de práticas de eutanásia do Concea (Brasil, 2018).

Os peixes foram eviscerados, para a avaliação do peso relativo do intestino ($\text{peso do intestino} / \text{peso total} \times 100$) e do índice hepatossomático ($\text{peso do fígado} / \text{peso total} \times 100$).

Parâmetros antioxidantes e oxidantes no sangue

Foram coletadas amostras 1ml de sangue, aos 60 dias de cultivo, por punção da veia caudal, com utilização de seringa de insulina. Antes da coleta, os

peixes foram anestesiados com eugenol (1 mg / L-1) e, com o auxílio de seringas contendo EDTA a 10%, foram coletadas amostras de sangue por punção da veia caudal. Este material foi alocado em dois tubos, sendo um dos tubos com EDTA para obtenção de sangue total para análises hematológicas e outro tubo sem anticoagulante para a obtenção do soro. Posteriormente, este material foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos e o soro separado, coletado e congelado (-20°C) para as análises.

A Peroxidação lipídica foi determinada através da metodologia, denominada FOX (Hermes-Lima et al., 1995; Monserrat et al., 2003), é baseado na oxidação de Fe (II) sob ácido condições e mede a quantidade de peróxidos lipídicos. Para as medições de peroxidação lipídica (LPO), FeSO₄ (1 mM), H₂SO₄ (0,25 M), xilenol laranja (1 mM, Sigma) e água destilada foram adicionados sequencialmente. Amostras (20 µL) ou metanol (brancos) foram adicionados e incubados por 450 min. Posteriormente, a absorbância (550 nm) foi determinado utilizando espectrofotômetro e hidroperóxido de cumeno (CHP, Sigma) foi empregado como um padrão. LPO foi expresso como hidroperóxido de cumeno (CHP) equivalentes por g de amostra quando tecidos ou mL quando amostra de soro.

A atividade de GST foi medida de acordo com Mannervik e Guthenberg (1981) com pequenas modificações. A atividade GST era medido pela taxa de formação de dinitrofenil-S-glutathiona a 340nm em um meio contendo fosfato de potássio 50mM, pH 6,5, 1mM GSH, 1mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato e sobrenadantes de tecido (aproximadamente 0,045 mg de proteína). Os resultados foram calculados e expressos como U / mg de proteína.

As atividades séricas e teciduais a SOD foi avaliada espectrofotometricamente conforme descrito por Marklund e Marklund (1974), baseado na reação da inibição do ânion superóxido na presença de piragolol. A atividade enzimática foi expressa em unidades SOD / mg de proteína.

A concentração das proteínas nas amostras foi determinada utilizando a metodologia de Bradford (1976) utilizando albumina bovina como padrão. Previamente foi construída uma curva de calibração com albumina e posteriormente a absorbância das amostras foi medida em 595 nm através de cubetas em espectrofotômetro. Em seguida a quantificação das proteínas totais nas amostras foi realizada.

Análise de cálcio e fósforo corporal e das vértebras

Foram coletados aleatoriamente dois peixes por tanque, para as análises do teor corporal de cálcio e fósforo (um aos 60 e outro aos 90 dias), e um peixe por repetição para avaliação dos referidos parâmetros nas carcaças (aos 90 dias de cultivo). Para os peixes íntegros, os mesmos foram pesados secos em estufa de circulação de ar por 24h a 55°C e moídos, enquanto que, para a remoção das vértebras, os peixes foram cozidos em aparelho de micro-ondas por 5min, para a posterior retirada manual das vértebras, sendo secas em estufa de circulação de ar por 12 h a 105°C. Tanto as amostras de peixes íntegros (60 e 90 dias) quanto das vértebras (90 dias) foram utilizadas para a determinação do teor de cinzas, cálcio e fósforo, de acordo com as técnicas descritas por Silva e Queiroz (2009).

Análise estatística

Os resultados experimentais foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e, como foram considerados normais, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e à análise de regressão linear e quadrática, a 0,05 de significância, utilizando-se o programa estatístico R.

3.3 RESULTADOS

DESEMPENHO

Não houve efeito ($P>0,05$) da adição da mistura fitogênica sobre o peso corporal, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade dos peixes no período de 1 a 30 dias de cultivo (Tabela 5). No período de 1 a 60 dias de cultivo, também não foi observado efeito da inclusão dos extratos herbais sobre o peso corporal, ganho de peso, e mortalidade ($P>0,05$), entretanto, observou-se tendência ($P=0,061$) de redução do consumo de alimento e efeito

quadrático ($P=0,024$) na conversão alimentar dos juvenis, de acordo com o aumento do nível adicionado na dieta.

No período de 1 a 90 dias de cultivo, não foram observadas alterações ($P>0,05$) sobre o peso corporal e ganho de peso, porém, na avaliação do consumo (Figura 1), houve redução linear ($P=0,017$; $Y=94,1892-0,0387x$, $r^2=0,22$) e efeito quadrático ($P=0,042$; $Y=99,0241-0,078x+0,0001x^2$, $r^2=0,25$) de acordo com a adição dos níveis crescentes dos fitogênicos fornecidos. Para a conversão alimentar desta fase, foi observada tendência linear ($P=0,089$) e quadrática ($P=0,097$), e para a mortalidade, houve redução linear ($P=0,019$; $Y=25,3336-0,0283x$, $r^2=0,21$) e efeito quadrático ($P=0,049$; $Y=28,6682-0,0617x+0,00001x^2$, $r^2=0,24$) conforme houve aumento da inclusão dos extratos herbais da alimentação das tilápias.

PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) nas avaliações do peso relativo intestinal e do índice hepatossomático dos peixes pertencentes aos diversos tratamentos avaliados (Tabela 6).

ANÁLISE ANTIOXIDANTE SÉRICA

Não houve efeito ($P>0,05$) da adição da mistura fitogênica sobre as análises séricas de proteínas totais e da enzima Superóxido-Dismutase (Tabela 7). No entanto, foi verificado efeito linear sobre os níveis da enzima Glutathione-S-Transferase ($P=0,047$) e efeitos linear ($p=0,026$) e quadrático ($P=0,049$) sobre a peroxidação lipídica (Figura 3) analisada no soro sanguíneo das tilápias.

NÍVEIS DE CÁLCIO E FÓSFORO CORPORAL E NAS VÉRTEBRAS

Não foi verificada alteração ($P>0,05$) sobre os níveis de cálcio corporal das tilápias aos 60 dias de cultivo, sendo observado aumento linear ($P<0,001$; $Y=13,13+0,005153X$, $r^2 = 0,45$) do teor de fósforo corporal dos peixes de acordo com o aumento da ingestão da combinação herbal na dieta (Tabela 8). Aos 90 dias de cultivo, observou-se aumento linear ($P=0,012$; $Y= 62,7312+0,0099X$, $R^2=0,25$) e efeito quadrático ($P= 0,029$; $Y=61,5462+0,0218X+0,000001X^2$, $R^2=0,28$) nos níveis de cálcio e efeito quadrático ($P=0,009$; $Y=12.7139-0,0058X+0,00002X^2$, $R^2=0,35$) nos níveis de fósforo corporal, além de efeito linear ($P=0,008$; $Y=113,475+0,0166X$, $R^2 = 0,27$) e quadrático ($P=0,001$; $108,8 + 0,06367x - 0,000059x^2$, $R^2 = 0,46$) nos níveis de cálcio nas vértebras, não havendo efeito sobre a deposição de fósforo neste local ($P>0,05$).

3.4 DISCUSSÃO

Os taninos hidrolisáveis sempre foram apontados como moléculas que prejudicam a digestibilidade e o desempenho de peixes e outras espécies (Buyukcapar et al., 2011), devido ao fato de se complexarem com a proteína a nível de lúmen intestinal, prejudicando sua digestão e absorção. No entanto, sua utilização em doses menores, com o conceito de “aditivo melhorador de desempenho”, tem gerado efeitos benéficos na produtividade de organismos aquáticos. A adição de taninos hidrolisáveis possui efeitos mais sólidos sobre o desempenho quando comparadas a adição de taninos condensados, pela melhor capacidade de solubilidade e também de liberação de compostos menores, como o ácido gálico, que potencializa seus efeitos.

O consumo dos peixes reduziu linearmente ao longo de todo o período de produção, devido ao efeito adverso na palatabilidade que os taninos conferem na ração. Tal situação gerou tendência de redução na conversão alimentar, uma vez que o ganho de peso corporal das tilápias não se reduziu na mesma intensidade.

A redução na mortalidade observada na presente pesquisa condiz com os efeitos benéficos da adição dos extratos de Emblica e do Manjeriçao-Santo descritos na literatura e o efeito sinérgico da combinação dos dois compostos fitogênicos potencializa seu efeito. Naturalmente, os dois extratos já são ricos em uma ampla gama de moléculas secundárias, (Van Doan et al., 2022), com

potencial fitoterápico, as quais podem interferir em vários mecanismos fisiológicos dos animais, melhorando o status imunitário e a resistência frente a patógenos (Prusty et al., 2007). Vários autores encontraram efeitos semelhantes no aumento da taxa de sobrevivência da utilização de um ou outro destes extratos herbais na alimentação de organismos aquáticos, como Tirkey e Thakur (2018), Chandrakala e Rajeswari (2019), Sikotariya e Yusufzai (2019), Srivastava et al. (2019), Saha et al. (2021) e Van Doan et al. (2021).

O peso relativo do intestino e o índice hepatossomático não foram alterados nos peixes analisados, independentemente do nível de suplementação utilizado. Isto indica que existe segurança fisiológica da utilização dos fitogênicos adicionados na dieta, uma vez que não houve hipertrofia ou redução no desenvolvimento proporcional destes órgãos.

A ausência de efeitos sobre os níveis de proteínas séricas totais era esperada, uma vez que os principais componentes desta fração compreendem a albumina e as globulinas, as quais são proteínas ligadas ao sistema imunológico do organismo. Seu aumento normalmente refere-se a uma ativação imunitária, a qual não responde, normalmente à adição de fitogênicos com caráter antioxidante no organismo. O mesmo comportamento foi observado na análise da presença sérica da enzima Superóxido-Dismutase, a qual normalmente é estimulada pela presença de vitamina E, selênio e outros minerais.

O aumento observado nos níveis de Glutathione-S-Transferase (GST) foi provocada pelo aumento da suplementação da mistura fitogênica na dieta. Como os taninos presentes exercem um efeito antioxidante natural, provavelmente houve uma economia metabólica do sistema antioxidante enzimático do organismo, refletindo na maior disponibilidade de GST no sangue. Este efeito também é corroborado pela menor lipoperoxidação verificada em nosso estudo, uma vez que houve forte redução da presença de moléculas lipídicas peroxidadas no sangue, comprovando o efeito antioxidante das moléculas presentes. As informações obtidas corroboram os achados de Chaudhary et al. (2020) e Zhu et al. (2021), os quais encontraram outros efeitos antioxidantes ao utilizar fontes de taninos na alimentação de organismo aquáticos.

Foi observado aumento nos níveis corporais de cálcio e de fósforo aumentaram de acordo com o aumento da suplementação da combinação fitogênica na alimentação dos juvenis de tilápias. Lozano-Sánchez et al. (2021),

ao avaliar a inclusão da mesma mistura herbal na alimentação de cordeiros, constataram aumento nos níveis séricos de fósforo, informação que vem ao encontro do verificado na presente pesquisa. Este aumento pode ser explicado pelas funções da vitamina C no organismo, a qual é responsável pela síntese de colágeno, um importante componente extra-celular da matriz óssea (Akbari et al., 2016), os quais requerem cálcio e fósforo para sua posterior mineralização. Ainda, esta situação ajuda a comprovar que as tilápias conseguem sintetizar vitamina C a nível hepático através da presença de seu precursor, a 2-cetogulonolactona, presente no extrato da Emblica.

Os dados das análises de cálcio das vértebras dos peixes avaliados vêm de encontro ao elucidado acima, pois foi observado aumento na deposição de cálcio ósseo de acordo com o aumento da dose da mistura fitogênica adicionada. Como a vitamina C sintetizada contribuiu para a melhor formação óssea, houve maior capacidade de deposição de cálcio, melhorando a qualidade óssea e aumentando a retenção de cálcio corporal. Com respeito ao fósforo, ao não haver efeito da adição dos extratos herbais sobre sua concentração nas vértebras, pode-se afirmar que este mineral não possui a mesma dependência da vitamina C, quando comparado ao cálcio, para a formação óssea.

Atualmente, a suplementação de ácido ascórbico na piscicultura ainda é restrita às fontes sintéticas, o que impossibilita um adequado atendimento das exigências nutricionais dos peixes. Os resultados obtidos poderão servir para validar a utilização de uma nova tecnologia que auxiliará no desenvolvimento da cadeia produtiva piscícola brasileira, melhorando a eficiência e a rentabilidade da atividade, permitindo desenvolvimento socioeconômico do produtor, contribuindo para a garantia de renda e qualidade de vida para as pessoas envolvidas nesta atividade. Atualmente, o estudo científico de alternativas que possam mitigar ou atenuar os problemas da falta de vitamina C no organismo dos peixes ainda são escassos, e as informações geradas na presente pesquisa poderão contribuir como base de uma nova linha científica de estudos na área.

A fonte herbal contribui para o suprimento de vitamina C na nutrição das tilápias-no-nilo, exercendo impacto positivo sobre o desempenho zootécnico, melhorando a capacidade antioxidante do organismo e sem causar prejuízo metabólico nos peixes. Entretanto, este composto fitogênico não pode ser utilizado como a única fonte de vitamina C para tilápias, pois a exigência média

de suplementação desta vitamina para a alimentação destes peixes é mais alta do que a ofertada pelos aditivos em suas doses testadas. Wu et al. (2015) encontraram requerimento de vitamina C na ordem de 53,05mg/kg para garantia de ganho de peso, enquanto que Soliman et al. (2008) descreveram a necessidade de 420mg de vitamina C por kg de ração, ambos valores calculados durante o processo de formulação das rações. Em nossa pesquisa, o conteúdo de 0,96% de 2-cetogulonolactona não é suficiente para gerar atendimento nutricional próximo aos descritos.

3.5 CONCLUSÃO

A adição da combinação fitogênica a base de *Emblica officinalis* e *Ocimum sanctum* reduz o consumo de alimento de forma linear, mantendo o ganho de peso e a conversão alimentar das tilápias-do-nilo. Sua suplementação reduz a mortalidade, aumenta o depósito de fósforo e cálcio corporal e o depósito de cálcio nas vertebrae e exerce efeito antioxidante, podendo ser utilizado adequadamente na alimentação de juvenis de tilápias.

Tabela 3 - Tratamentos utilizados

Tratamento	Molécula
T0	Ração basal
T200	200mg/kg da combinação herbal
T400	400mg/kg da combinação herbal
T600	600mg/kg da combinação herbal
T800	800mg/kg da combinação herbal

Tabela 4 - Composição alimentar e nutricional da ração basal experimental

Ingrediente	Inclusão
Farinha de Vísceras de aves g/kg	469,12
Farelo de Soja 46%, g/kg	210,88
Farinha de Peixe, g/kg	150,00
Milho integral, g/kg	140,00
Óleo de Soja, g/kg	25,00
Suplemento vitamínico e mineral ¹ , g/kg	5,00
Valores Calculados	
Proteína bruta, g/kg	460,00
Energia digestível, kcal/kg	3640,00
Fibra bruta, g/kg	22,88
Extrato etéreo, g/kg	97,73
Lisina, g/kg	27,11
Met. + Cis., g/kg	15,90
Cálcio, g/kg	30,44
Fósforo disponível, g/kg	18,39
Sódio, g/kg	3,60

¹ Suplemento Vitamínico contendo por kg do produto: Vit. A - 6.500.000 U.I.; Vit. D3 - 2.500.000 U.I.; Vit. E - 30.000 U.I.; Vit. B1 - 3,0g; Vit. B2 - 3,75; Vit. B6 - 3,0g; Vit. B12 - 0,010g; Ácido Pantotênico - 12,0g; Biotina - 0,150g; Vit. K3 - 2,0g; Ácido Fólico - 0,250g; Ácido Nicotínico - 35,0g; Excipiente q.s.p - 1000g; Ferro - 50,0g; Cobalto - 2,0g; Cobre - 10,0g; Manganês - 80,0g; Zinco - 66,60g; Iodo - 6,66g; Selênio 233 mg e Excipiente q.s.p - 1000g;

Tabela 5 - Desempenho de tilápias-do-nilo suplementadas com diferentes níveis de fonte herbal de vitamina C na dieta

1 a 30 dias					
Tratamento	Peso/peixe (g)	Ganho de peso/peixe (g)	Consumo/peixe (g)	CA	Mortalidade (%)
0 mg/kg	6,52	5,25	7,79	1,48	5,71
200mg/kg	7,22	5,97	8,51	1,42	2,86
400mg/kg	6,74	5,34	7,94	1,49	5,71
600mg/kg	6,87	5,64	7,04	1,25	2,86
800mg/kg	6,26	5,06	6,48	1,28	0,00
CV (%)	12,38	15,34	21,23	26,32	10,51
P Linear	0,535	0,554	0,221	0,230	0,570
P Quadrático	0,267	0,586	0,369	0,500	0,562
1 a 60 dias					
Tratamento	Peso/peixe (g)	Ganho de peso/peixe (g)	Consumo/peixe (g)	CA	Mortalidade (%)
0 mg/kg	11,54	10,08	14,42	1,43	14,28
200mg/kg	12,83	11,54	13,68	1,18	5,71
400mg/kg	12,44	11,03	12,97	1,17	5,71
600mg/kg	12,12	10,89	11,86	1,09	2,86
800mg/kg	10,88	9,64	11,35	1,18	2,86
CV (%)	14,64	15,69	24,21	26,33	13,64
P Linear	0,574	0,528	0,061	0,141	0,144
P Quadrático	0,161	0,147	0,186	0,024 ^a	0,357
1 a 90 dias					
Tratamento	Peso/peixe (g)	Ganho de peso/peixe (g)	Consumo/peixe (g)	CA	Mortalidade (%)
0 mg/kg	33,07	31,09	62,63	2,01	25,00
200mg/kg	32,16	30,48	53,87	1,77	13,33
400mg/kg	33,68	31,89	56,09	1,76	16,67
600mg/kg	30,31	28,87	47,11	1,63	3,33
800mg/kg	29,30	27,79	47,36	1,70	6,67
CV (%)	17,81	18,40	20,77	22,57	88,45
P Linear	0,753	0,879	0,017 ^b	0,089	0,019 ^d
P Quadrático	0,509	0,523	0,042 ^c	0,097	0,049 ^e

^aY=1,4983-0,0015x+0,00003x² R²=0,16

^bY=94,1892 - 0,0387x R² = 0,22

^cY=99,0241 - 0,078x + 0,0001x² R² = 0,25

^dY=25,3336 - 0,0283x R² = 0,21

^eY=28,6682 - 0,0617x + 0,00001x² R² = 0,24

Tabela 6 - Peso relativo de órgãos e índice hepatossomático de tilápias-do-nylo suplementadas com diferentes níveis de fonte herbal de vitamina C na dieta aos 90 dias de cultivo

Tratamento	Peso relativo do intestino (%)	Índice hepatossomático (%)
0 mg/kg	8,07	1,77
200mg/kg	8,63	1,60
400mg/kg	9,68	1,77
600mg/kg	8,74	1,98
800mg/kg	10,04	2,03
CV (%)	19,23	24,46
P Linear	0,128	0,264
P Quadrático	0,325	0,517

Tabela 7- Parâmetros antioxidantes no sangue de tilápias-do-nilo suplementadas com diferentes níveis de fonte herbal de vitamina C na dieta

Tratamento	Proteínas Totais (mg/mL)	Atividade SOD (U/mg proteína)	GST (U/mg proteína)	Níveis LPO (nmol/mL)
0 mg/kg	5,98	6,97	26,49	7919,12
200mg/kg	6,35	6,74	21,01	4627,92
400mg/kg	4,24	8,47	24,49	5202,13
600mg/kg	5,49	7,56	38,69	4540,58
800mg/kg	6,77	7,79	36,92	4068,82
CV (%)	25,75	18,00	49,42	49,92
P Linear	0,879	0,182	0,047 ^a	0,040 ^b
P Quadrático	0,205	0,330	0,153	0,071 ^c

SOD – Superóxido-dismutase; GST – Glutathiona-S-Transferase; LPO – Peroxidação lipídica

^aY = 218196 + 0,0193x R2 = 0,16

^bY = 6848 – 3974x R2 = 0,19

^cY = 7458.2338 – 10,1813x + 0,0079x² R2 = 0,24

Tabela 8 - Mineralização corporal e das vértebras de tilápias-do-nylo suplementadas com diferentes níveis de fonte herbal de vitamina C na dieta

Dose de Inclusão	Ca corporal 60d (g/kg)	P corporal 60d (g/kg)	Ca corporal 90d (g/kg)	P corporal 90d (g/kg)	Ca vértebras (g/kg)	P vértebras (g/kg)
0 mg/kg	40,71	13,41	61,33	12,81	107,24	12,46
200mg/kg	42,78	13,62	65,48	11,46	123,27	11,68
400mg/kg	45,57	15,70	68,68	13,10	121,63	12,88
600mg/kg	43,29	15,69	68,08	12,33	125,95	12,23
800mg/kg	43,07	17,53	69,95	14,45	122,54	12,89
CV (%)	8,00	14,60	8,65	14,55	7,71	11,15
P Linear	0,296	<0,001 ^a	0,012 ^b	0,099	0,008 ^e	0,232
P Quadrático	0,384	0,214	0,029 ^c	0,009 ^d	0,001 ^f	0,498

Ca – Cálcio. P – Fósforo.

^aY=13,13+0,005153x. R2 = 0,45

^bY= 62,7312+0,0099X R2=0,25

^cY=61,5462+0,0218X+0,000001X² R2=0,28

^dY=12.7139-0,0058X+0,00002X² R2=0,35

^eY=113,475+0,0166X R2 = 0,27

^f108,8 + 0,06367x – 0,000059x² r2 = 0,46

Figura 2 - Efeitos linear e quadrático do consumo de ração de peixes alimentados com diferentes níveis de extratos herbais na dieta aos 90 dias de cultivo

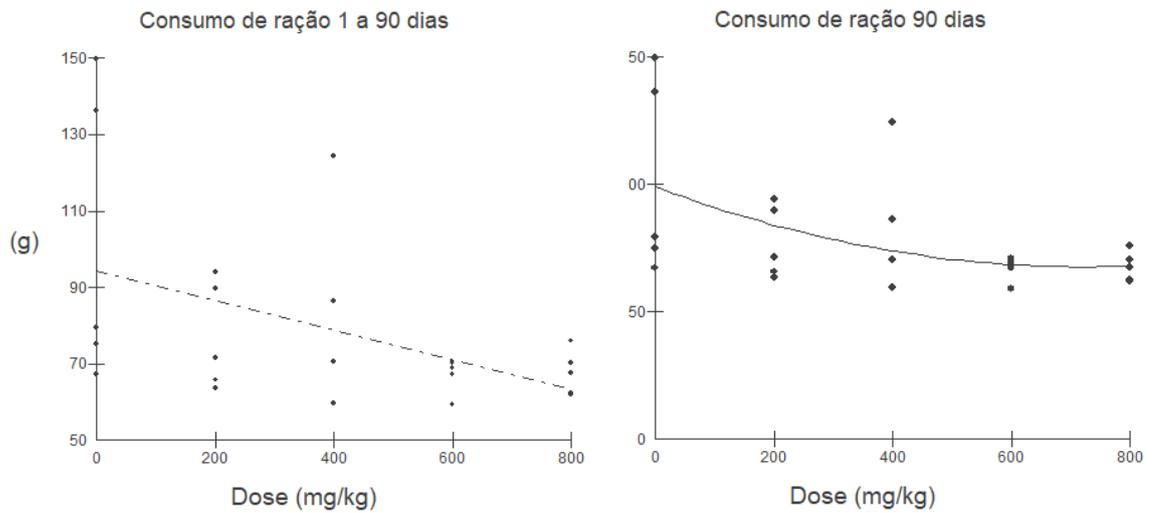
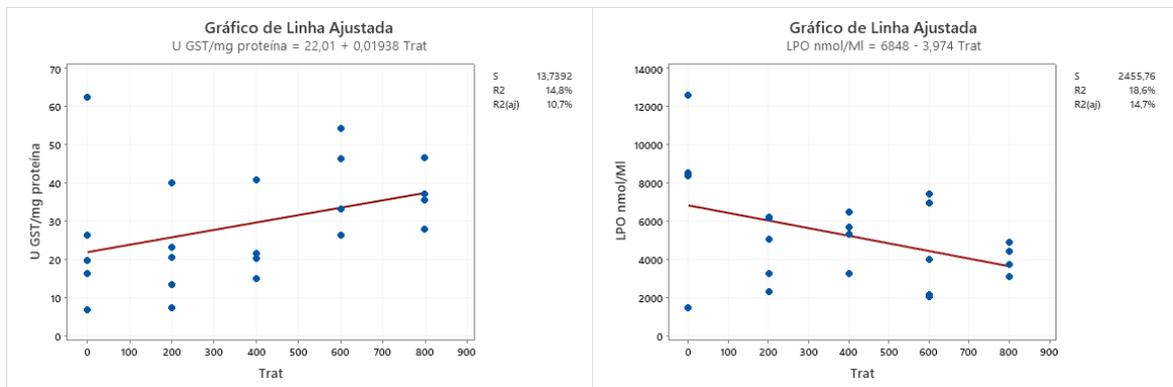


Figura 3 - Efeito linear dos níveis de GST e da lipoperoxidação lipídica aos 90 dias de cultivo de peixes alimentados com diferentes níveis de extratos herbais na dieta



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização dos taninos hidrolisáveis permite melhorar a taxa de sobrevivência dos alevinos de tilápias, mantendo o desempenho zootécnico e gerando efeitos antioxidantes no organismo. A adição da combinação fitogênica de *Emblica officinalis* e *Ocimum sanctum* possui forte potencial de inclusão na aquicultura, uma vez que sua inclusão, em nível de aditivo, não gera os conhecidos efeitos negativos dos taninos hidrolisáveis na nutrição de organismos aquáticos.

Atualmente, a suplementação de ácido ascórbico na piscicultura ainda é restrita às fontes sintéticas, o que impossibilita um adequado atendimento das exigências nutricionais dos peixes. Os resultados obtidos poderão servir para validar a utilização de uma nova tecnologia que auxiliará no desenvolvimento da cadeia produtiva piscícola brasileira, melhorando a eficiência e a rentabilidade da atividade, permitindo desenvolvimento socioeconômico do produtor, contribuindo para a garantia de renda e qualidade de vida para as pessoas envolvidas nesta atividade. Atualmente, o estudo científico de alternativas que possam mitigar ou atenuar os problemas da falta de vitamina C no organismo dos peixes ainda são escassos, e as informações geradas na presente pesquisa poderão contribuir como base de uma nova linha científica de estudos na área.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, B., SIMON, J. Tannins and their complex interaction with different organic nitrogen compounds and enzymes: old paradigms versus recent advances. **Chemistry Open**, v.6, n.5, p.610–61, 2017.
- AKBARI, A., JELODAR, G., NAZIFI, S., SAJEDIANFARD, J. An overview of the characteristics and function of vitamin C in various tissues: Relying on its antioxidant function. *Zahed. J. Res. Med. Sci.* v.18, n.11, e4037, 2016.
- BALIGA, M.S., D'SOUZA, J.J. Amla (*Emblica officinalis* Gaertn.), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer. **Eur J Cancer Prev** v.20, p.225–239, 2011.
- BENZIE, I.F.F., STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytic. Biochem.** v.239, p.70-76, 1996.
- BORAH, R., BISWAS, S. P. Tulsi (*Ocimum sanctum*), excellent source of phytochemicals. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v.3, n.5, p.1732-1738, 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p. 248–254, 1976.
- Brasil, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, 2018. **Resolução Normativa CONCEA nº 37**, de 15.02.2018.
- BULE, M., KHAN, F., NISAR, M.F., NIAZ, K. Tannins (hydrolysable tannins, condensed tannins, phlorotannins, flavono-ellagitannins). In: **Recent Advances in Natural Products Analysis**. Elsevier, 2020. 132-146p.
- BUYUKCAPAR, H.M., ATALAY, Í., KAMALAK, A. Growth Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed with Diets Containing Different Levels of Hydrolysable and Condensed Tannin. **J. Agr. Sci. Tech**, v.13, p.1045-1051, 2011.
- CHANDRAKALA, N., RAJESWARI, S. In vitro antiviral activity of *emblica officinalis* and *ocimum sanctum* against *vibrio* sp isolated from diseased *Penaeus monodon* (Fab). **The International journal of analytical and experimental modal analysis**, v.11, n.9, p.4510-4522, 2019.
- CHAUDHARY, A., SHARMA, S., MITTAL, A., GUPTA, S., DUA, A. Phytochemical and antioxidant profiling of *Ocimum sanctum*. **J Food Sci Technol**, v.57, p.3852–3863, 2020.
- COLLIER, H.B. Standardization of Blood Haemoglobin Determinations. **Can. Med. Assoc. J**, v.50, n.6, p.550–552, 1944.

D'SOUZA, P., MURALIDHAR, T.S. Effect of Phytocee™ (a Phytogetic feed additive) on survivability of Zebra fish subjected to ammonia stress. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v.7, n.5, p.459-462, 2019.

DABROWSKI, K. Gulonolactone oxidase is missing in teleost fish. The direct spectrophotometric assay. **Biol Chem Hoppe Seyler**, v.371, n.3, p.207-14, 1990.

DARIAS, M.J.; MAZURAS, D.; KOUMOUNDOUROS, G.; CAHU, C.L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L. Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. **Aquaculture**, v.315, p.49-60, 2011. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.12.030.

EFENDI, A.M., EDISON, E., SUMARTO, S. Study on the Hibernation of Tilapia Fish (*Oreochromis Niloticus*) by Using the Extract of Ruku-ruku Leaves (*Ocimum Sanctum* L.) during Dry System Transportation. **Journal Online Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau**, v.3, n.2, p.1-10, 2016.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clin. Biochem**, v.37, p.277–285, 2004.

FERNANDES, F.H.A. SALGADO, H.R.N. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification, **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.46, n.3, p.257-265, 2016.

FRAGA-CORRAL, M., OLIVEIRA, P.G., PEREIRA, A.G., LOPES, C.L., LOPEZ, C.J., PRIETO, M.A., GANDARA, J.S. Technological Application of Tannin-Based Extracts. **Molecules**, v.25, n.614, p.1-27, 2020.

GHIRAIDELLI, L., MARTINS, M.L., YAMASHITA, M.M., JERONIMO, G.T. Haematology of *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) and *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) maintained in different conditions of handling and feeding from the State of Santa Catarina, Brazil. **Acta Sci. Biol. Sci**, v.28, n.4, p.319–325, 2006. doi:10.4025/actascibiolsci.v28i4.162.

GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Am. J. Clin. Pathol**, v.56, n.1, p.35–39, 1971.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE, J.M.C., 2007. **Free radicals in biology and medicine**, 4a ed. Nova Iorque: Oxford University Press, 2007.

HE, M., TIAN, H., LUO, X., QI, X., CHEN, X. Molecular progress in research on fruit astringency. **Molecules**, v.20, n.1, p.1434–1451, 2015.

- HERMES-LIMA, M., WILLIAM, G., STOREY, K. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. **Free Radic. Biol. Med**, v.19, n.3, p.271–280, 1995.
- INGALE, V.M., MORE, H.G., KAD, V.P. Determination of engineering properties of aonla (*Phyllanthus emblica* L or *Emblica officinalis* G) fruits. **J Krishi Vigyan**, v.4, p.12–15, 2016.
- JENTZSCH, A.M., BACHMANN, H., FÜRST, P., BIESALSKI, H.K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Bio. Med**. v.20, n.2, p.251- 256, 1996.
- JINDAL, R., SINHA, R. Malachite Green Induced Ultrastructural Corneal Lesions in *Cyprinus carpio* and Its Amelioration Using *Emblica officinalis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.102, p.377–384, 2019.
- KITUNEN, V., ADAMCZYK, S., SMOLANDER, A., et al. Salivary proline-rich protein may reduce tannin-iron chelation:a systematic narrative review. **Chemistry Open**, v.14, n.47, 2017.
- KUMAR, J.S., MANJUNATH, S., SAKHARE, P.M. A study of antihyperlipedemia, hypolipedemic and anti-atherogenic activity of fruit of *Emblica officinalis* (amla) in high fat fed Albino rat. **Int J Med Res Health Sci** v.2, p.70–77, 2013.
- KUMAR, R., SAHA, P., LOKARE, P., DATTA, K., SELVAKUMAR, P., CHOURASIA, A. A Systemic Review of *Ocimum sanctum* (Tulsi): Morphological Characteristics, Phytoconstituents and Therapeutic Applications. **International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology**, v.9, n.2, p.121-126, 2022.
- MAISAK, H., JANTRAKAJORN, S., LUKKANA, M., WONGTAVATCHAI, J. Antibacterial Activity of Tannin from Sweet Chestnut Wood against *Aeromonas* and *Streptococcal* Pathogens of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Thailand Journal of Veterinary Medicine**, v.43, n.1, p.105-111, 2013.
- MAISAK, H., JANTRAKAJORN, S., LUKKANA, M., WONGTAVATCHAI, J. Antibacterial activity of tannin from sweet chestnut wood against *aeromonas* and *streptococcal* pathogens of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Thai J. Vet. Med**, v.43, p.105-111, 2013.
- MANNERVIK, B., GUTHENBERG, C. Glutathione transferase (human placenta). **Methods Enzymol**, v.77, p.231–235, 1981.
- MARKLUND, S., MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, **Eur. J. Biochem**, v.47, n.3, p.469–474, 1974.

MONSERRAT, J.M., GERACITANO, L.A., PINHO, G.L.L., VINAGRE, T.M., FALEIROS, M., ALCIATI, J.C., BIANCHINI, A. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe (III) xylenol orange complex formation. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**, v.45, n.2, p.177–183, 2003.

MURTHY, Z.V.P., JOSHI, D. Fluidized bed drying of Aonla (*Emblica officinalis*). **Dry Technol**, v.25, p.883–889, 2007.

NAIDU, K.A., 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery An overview. **Nutr. J**, v.2, p.7-16, 2003.

NCUBE, B., VAN STADEN, J. Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. **Molecules**, v.20, n.7, p.12698–12731, 2015.

NOVRIADI, R., FADHILAH, R., WAHYUDI A.E., TRULLÀS, C. Effects of hydrolysable tannins on the growth performance, total haemocyte counts and lysozyme activity of pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquacult. Rep**, v.21, e100796, 2021.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem**, v.95, n.2, p.351–358, 1978.

PAUL, R., KHANNA, A., & BHANDARI, R. Quantitative analysis and antimicrobial activities of *Phyllanthus emblica* (L) leaf extracts against fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Advanced Scientific Research**, v.11, n.4, p.166-170, 2020.

PINTO, L.G.Q., PEZZATTO, L.E., EDMA, C.M., BARROS, M.M., FURUYA, W.M. Ação do tanino na digestibilidade de dietas pela tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, v.22, n.3, p.677-681, 2000.

PRUSTY, A.K., SAHU, N.P., PAL, A.K. REDDY, A.K., KUMAR S. Effect of dietary tannin on growth and haemato-immunological parameters of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. **An. Feed Sci. Tech**, v.136, n.1, p.96-108, 2007.

RANZANI-PAIVA, M.T., PÁDUA, S.B.D., TAVARES-DIAS, M., EGAMI, M., 2013. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1a Ed. Maringá: Eduem, 2013.

ROSENFELD, G. Corante pancromatico para hematología e citologia humana. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rapido. **Meml. Inst. Butantan**, v.20, p.328–334, 1947.

ROTA, M.A. **Utilização do Ácido Ascórbico (Vitamina C) pelos Peixes**. Documentos, 49. Corumbá: Embrapa, 2003.

SAHA, S., JANA, P., GHOSH, T.K., MANDAL, R.N., MAITI, S., KARMAKAR, S., DEY, B., BODA, S.N. Immunostimulatory potency developed in *Pangasianodon hypophthalmus* against *Aeromonas hydrophila* through *Ocimum sanctum*

supplemented diet. **Animal nutrition and feed technology**, v.21, n.1, p.135-150, 2021.

SAHA, S., JANA, P., GHOSH, T.K., MANDAL, R.N., MAITI, S., KARMAKAR, S., DEY, B., BODA, S.N. Immunostimulatory potency developed in *Pangasianodon hypophthalmus* against *Aeromonas hydrophila* through *Ocimum sanctum* supplemented diet. **Anim. Nutr. Feed. Tech**, v.21, n.1, p.135-150, 2021.

SETHI, L., BHADRA, P. A Review Paper on Tulsi Plant (*Ocimum sanctum* L.). **Indian Journal of Natural Sciences**, v.10, n.60, p.20854-20860, 2020.

SHANAKA, K.A.S.N., JUNG, S., JANSON, N. D., JAYASINGHA, J.R.P., MADUSHANI, K.P., KIM, M.J., LEE, J. Growth and Antioxidant-Related Effects of the Reestablished Ascorbic Acid Pathway in Zebrafish (*Danio rerio*) by Genomic Integration of L-Gulonolactone Oxidase From Cloudy Catshark (*Scyliorhinus torazame*). **Front. Physiol**, v.12, e685595, 2021.

SIKOTARIYA, S., YUSUFZAI, S.I. Effect of *Ocimum sanctum* (Tulsi) powder on the growth and survival in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.7, n.4, p.239-244, 2019.

SIKOTARIYA, S., YUSUFZAI, S.I. Effect of *Ocimum sanctum* (Tulsi) powder on the growth and survival in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. **J. Entomol. Zool. Stud.** v.7, n.4, p.239-244, 2019.

SINGH, D., CHAUDHURI, P. K. A review on phytochemical and pharmacological properties of Holy basil (*Ocimum sanctum* L.). **Industrial Crops and Products**, v.118, p.367–382, 2018.

SINGH, S., SINGH A.K., JOSHI, H.K. Standardization of maturity indices in Indian gooseberry (*Emblica officinalis* Gaertn) under semi-arid conditions of Gujarat. **Indian J Agric Sci**, v.76, p.591–595, 2006.

SINHA, R., JINDAL, R. Augmenting fish health using *Emblica officinalis* against triarylmethane dye induced blood toxicity in *Cyprinus carpio*. **Aquaculture research**, v.50, n.6, p.1644-1650, 2019.

SINHA, R., JINDAL, R., FAGGIO, C. Nephroprotective effect of *Emblica officinalis* fruit extract against malachite green toxicity in piscine model: Ultrastructure and oxidative stress study. **Microscopy research & technique**, v.84, n.8, p.1911-1919, 2021

SOLIMAN, A.K., JAUNCEY, K., ROBERTS, R.J. Water-soluble vitamin requirements of tilapia: Ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquacult. Res**, v.25, p.269 – 278, 2008.

SONKAR, N., RAJORIYA, D., CHETANA, R. et al. Effect of cultivars, pretreatment and drying on physicochemical properties of Amla (*Emblica officinalis*) gratings. **J Food Sci Technol**, v.57, p.980–992, 2020.

SRIVASTAVA, A., ANSAL, M.D., KHAIRNAR, O. Effect of amla (*Phyllanthus emblica*) fruit powder supplemented feed on growth performance and proximate composition of an Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.) fingerlings. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.7, n.3, p.955-959, 2019.

SRIVASTAVA, A., ANSAL, M.D., KHAIRNAR, O. Effect of amla (*Phyllanthus emblica*) fruit powder supplemented feed on growth performance and proximate composition of an Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.) fingerlings. **J. Entomol. Zool. Stud**, v.7, n.3, p.955-959, 2019.

TANTA, M., SAXENA, A. Effect of Amla (*Emblica officinalis*) on the Hematology and Serum Biochemical Parameters of Rohu Fingerlings in Tarai Conditions of Uttarakhand, India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.7, n.10, p.2188-2194, 2018.

TEWARI, R., KUMAR, V., SHARMA, H.K. Physical and chemical characteristics of different cultivars of Indian gooseberry (*Emblica officinalis*). **J Food Sci Technol** v.56, p.1641–1648, 2019.

TIKEYM S.S., THAKUR, G.K. Impact of Oberon (insecticide) and remedial impact of Tulsi (*Ocimum sanctum*) on hematological parameters of air-breathing fish *Channa punctatus*. **Innovations in Pharmaceuticals and Pharmacotherapy**, v.6, n.2, p.27-31, 2018.

TIRKEY, S.S., THAKUR, G.K. Impact of Oberon (insecticide) and remedial impact of Tulsi (*Ocimum sanctum*) on hematological parameters of air-breathing fish *Channa punctatus*. **Innov. Pharm. Pharmacot.** v.6, p.27-31, 2018.

VAN DOAN, H., CHOMPUNUT, L., KORAWAN S., HOSEINIFAR, S.H., DAWOOD, M.A.O., EL-HAROON, E., HARIKRISHNAN, R., JATURASITHA, S., PAOLUCCI, M. Impacts of Amla (*Phyllanthus emblica*) fruit extract on growth, skin mucosal and serum immunities, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised under biofloc system. **Aquaculture Reports**, v.22, e100953, 2022.

VAN DOAN, H., CHOMPUNUT, L., KORAWAN S., HOSEINIFAR, S.H., DAWOOD, M.A.O., EL-HAROON, E., HARIKRISHNAN, R., JATURASITHA, S., PAOLUCCI, M. Impacts of Amla (*Phyllanthus emblica*) fruit extract on growth, skin mucosal and serum immunities, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised under biofloc system. **Aquacult. Rep.** V.22, e100953, 2022.

WU, F., HUANG, F., WEN, H., JIANG, M., LIU, W., TIAN, J., YANG, C.G. Vitamin C requirement of adult genetically improved farmed tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquacult International**, v.23, p.1203–1215, 2015.

YAO, Y., CHEN, P., RINGØ, E., ZHANG, G., HUANG, Z., HUA, X. Effect of Diet Supplemented With Rapeseed Meal or Hydrolysable Tannins on the Growth, Nutrition, and Intestinal Microbiota in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Front. Nut.** v.6, p.154, 2019.

ZHU, X.F., GUO, H., LI, G.L., ZHU, C.H. Effects of dietary hydrolyzable tannins on growth performance, antioxidant capacity, intestinal microflora and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture Reports**, v.19, e100601, 2021.

ZHU, X.F., GUO, H., LI, G.L., ZHU, C.H. Effects of dietary hydrolyzable tannins on growth performance, antioxidant capacity, intestinal microflora and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquacult. Rep.** v.19, e100601, 2021.

ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA

O CAMPO ABAIXO É DE PREENCHIMENTO DA CEUA

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA/UNOESC

DE ACORDO COM O EXPOSTO ACIMA, A CEUA PROCEDE COM O SEGUINTE RELATO:

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO		
Protocolo de Pesquisa CEUA nº 14/2021	Pesquisa (<input checked="" type="checkbox"/>)	
Título do Projeto: Utilização de fitogênicos como fonte de vitamina C na alimentação de tilápias-do-nylo (<i>Oreochromis niloticus</i>)		
Data de Início: 07/05/2021		
Data do Término: 19/12/2021		
Pesquisador Responsável: Tiago Goulart Petrolli		
Unoesc de: Xanxerê	Área: ACVS	Curso: Zootecnia
II – ANÁLISE DO PROTOCOLO		
Justificativa/Relevância (item 2.5): A justificativa apresentada é relevante do ponto de vista técnico e científico.		
<p>Metodologia: Será conduzido um experimento nas instalações do setor de piscicultura da UNOESC Xanxerê, sendo utilizadas 175 tilápias, da linhagem GIFT, com peso médio inicial de 5g e comprimento médio de 3cm, em um período experimental de 90 dias de cultivo. Os animais serão divididos em grupos que receberão diferentes tratamentos de suplementação herbal de vitamina C. Aos 60 dias de cultivo, os animais terão amostras de sangue coletadas via veia caudal, com procedimento anestésico com eugenol. O sangue passará por análises bioquímicas e hematológicas para comparação dos grupos. Além disso, os animais serão medidos e pesados. Os animais não serão eutanasiados após o estudo.</p>		
<p>Análise Benefícios: Trata-se de pesquisa zootécnica importante para o desenvolvimento de métodos produtivos e de manejo melhores para criação de tilápias.</p>		
<p>Orçamento financeiro detalhado da pesquisa e fonte de recursos. Sim.</p>		
O protocolo apresentou todos os anexos?		

- Termo de Consentimento do Proprietário do Animal (assinado); Sim
- Termo do Responsável da Instituição (assinado); Sim
- Termo de Responsabilidade do Pesquisador (assinado); Sim
- Declaração do responsável pela manutenção dos animais – SE FOR O CASO (assinado).

OPÇÃO 1 - APROVADO

III - PARECER DO RELATOR

Trata-se de pesquisa zootécnica importante para o desenvolvimento de métodos produtivos e de manejo melhores para criação de tilápias. Toda a documentação e metodologia está de acordo com o preconizado pelo CONCEA.

IV - PARECER DO COLEGIADO DA CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), acompanha o voto do Relator pela **APROVAÇÃO** do protocolo acima.

1) A licença da CEUA é de até 2 (dois) anos, a contar da data emissão deste parecer. 2) Emendas: extensão, prorrogação, alteração do número amostra etc, devem seguir as orientações expostas no site da CEUA. 3) Ao término do estudo, o pesquisador tem 30 (trinta) dias para envio do Relatório, de acordo com o modelo disposto no site da CEUA, se o estudo derivou submissão ou publicação de artigo este deve ser anexado. 4) O pesquisador que estiver pendente com a entrega de relatório(s) de protocolo anteriores, não poderá submeter novo protocolo para análise da CEUA.

Data da Reunião: 30/03/2021



Prof. Sérgio Abreu Machado
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de
 Animais (CEUA) da Unoesc.