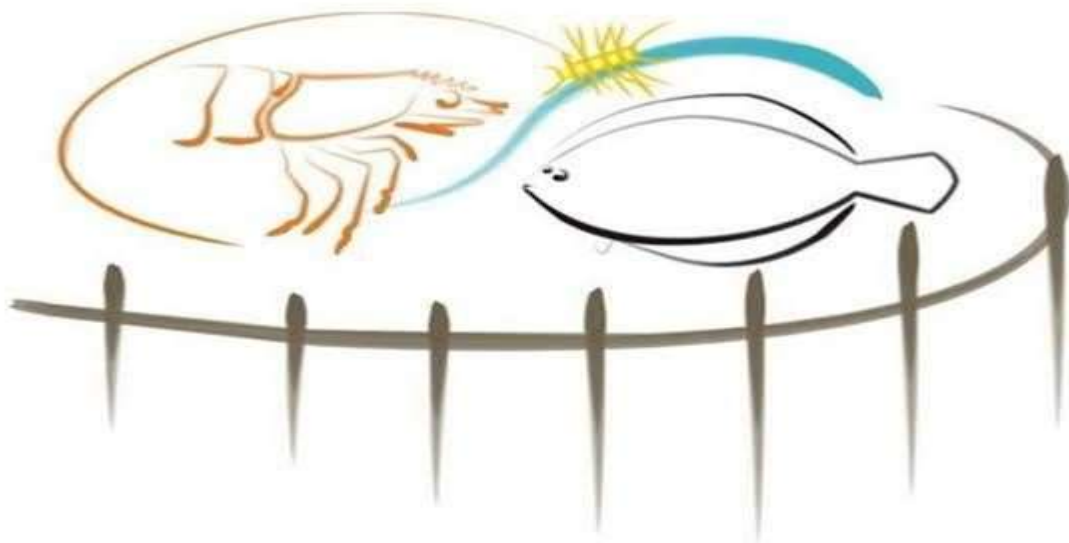




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DAS FOLHAS DE MESTRUZ (*Coronopus didymus*) EM RAÇÕES PARA PEIXES

ALEX ZEFANIAS BALOI

RIO GRANDE, RS

Novembro, 2024

Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Otimização da extração e avaliação de antioxidantes das folhas de mestruz (*coronopus didymus*) em rações para peixes.

Alex Zefanias Baloi

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a Vilásia Guimarães Martins

Co-orientador: Prof. Dr Marcelo Borges Tesser

RIO GRANDE, RS

Novembro, 2024

Ficha Catalográfica

B195o Baloi, Alex Zefanias.

Otimização da extração e avaliação de antioxidantes das folhas de mestruz (*coronopus didymus*) em rações para peixes / Alex Zefanias Baloi. – 2024.

64 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2024.

Orientadora: Dra. Vilásia Guimarães Martins.

Coorientador: Dr. Marcelo Borges Tesser.

1. Aquicultura 2. Oxidação lipídica 3. Rações I. Martins, Vilásia Guimarães II. Tesser, Marcelo Borges III. Título.

CDU 639.3.05

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

ATA 16/2024

ATA DE DEFESA DA 242ª DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AQUICULTURA

No dia vinte e dois de novembro de dois mil e vinte e quatro, às nove horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado em Aquicultura, de **ALEX ZEFANIAS BALOI**, orientado pelo Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins, composta pelos seguintes membros: Prof. Dra. Vilásia Guimarães Martins (Orientadora – EQA/FURG), Prof. Dr. Carlos Frederico Cecon Lanes (UNIPAMPA) e Profa. Dra. Juliane Ventura Lima (ICB-FURG). Título da Dissertação: “**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DAS FOLHAS DE MESTRUZ (*Coronopus didymus*) EM RAÇÕES PARA PEIXES**”. Dando início à defesa, o Coordenador do PPGAq Prof. Dr. Ricardo Vieira Rodrigues, passou a presidência da sessão a Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins, que na qualidade de orientadora, passou a palavra para o candidato apresentar a Dissertação. Após ampla discussão entre os membros da Banca e o candidato, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da Dissertação, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. O candidato **ALEX ZEFANIAS BALOI** foi considerado **APROVADO**, devendo a versão definitiva da Dissertação ser entregue a Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pelo candidato e pelo Coordenador do PPGAq.

Documento assinado digitalmente
VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS
Data: 21/11/2024 12:00:06-0300
Verifique em: <https://web.rj.gov.br>

PROF.a. DRA. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS (ORIENTADORA – EQA/FURG)

Documento assinado digitalmente
CARLOS FREDERICO CECON LANES
Data: 21/11/2024 12:54:03-3360
Verifique em: <https://web.rj.gov.br>

PROF. DR. CARLOS FREDERICO CECON LANES (UNIPAMPA)

Documento assinado digitalmente
JULIANE VENTURA LIMA
Data: 21/11/2024 12:02:25-0300
Verifique em: <https://web.rj.gov.br>

PROF.a. DRA. JULIANE VENTURA LIMA (ICB-FURG)

Documento assinado digitalmente
ALEX ZEFANIAS BALOI
Data: 21/11/2024 12:34:50-4300
Verifique em: <https://web.rj.gov.br>

ALEX ZEFANIAS BALOI

Documento assinado digitalmente
RICARDO VIEIRA RODRIGUES
Data: 21/11/2024 13:34:34-0300
Verifique em: <https://web.rj.gov.br>

PROF. DR. RICARDO VIEIRA RODRIGUES (Coordenador do PPGAq)

Sumário

1. Introdução Geral.....	12
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. Referências.....	14
CAPÍTULO 1	17
RESUMO	17
1. Introdução.....	19
2. Material e Métodos	21
2.1. Reagentes	21
2.2. Folhas de mestruz.....	21
2.3. Otimização do processo de extração dos compostos ativos das folhas de mestruz.....	21
2.4. Análise de compostos ativos dos extratos	22
2.4.1. Determinação do conteúdo total de polifenóis	22
2.4.2. Determinação das atividades antioxidantes	23
2.5. Atividade Antimicrobiana	24
3. Resultados.....	24
3.1. Determinação e validação de modelos.....	24
3.2. Atividades antimicrobianas	31
4. Discussão	33
5. Conclusão.....	36
6. Referências.....	37
CAPÍTULO II	42
RESUMO	42
1. Introdução.....	44
2. Material e Métodos	45
2.1. Reagentes	45
2.2. Folhas de mestruz.....	46
2.3. Procedimento de extração.....	46
2.4. Cálculo da equivalência de atividade antioxidante.....	46
2.5. Formulação das dietas com os antioxidantes	47
2.5.1. Condições de armazenamento.....	48
2.5.2. Composição Proximal da ração	48
2.6. Peroxidação lipídica.....	48

2.7. Análise de compostos ativos dos extratos da ração	49
2.7.1. Determinação do conteúdo total de polifenóis	49
2.7.2. Atividade Sequestradora de radicais DPPH	50
2.7.3. Eliminação de radicais ABTS	50
2.8. Análise Estatística	50
3. Resultados	50
3.1. Peroxidação lipídica	50
3.2. Compostos fenólicos e atividades antioxidantes	52
3.2.1. Conteúdo total de polifenóis	52
3.2.2. Atividade Sequestradora de radicais DPPH	53
3.2.3. Eliminação de radicais ABTS	54
3.3. Temperatura e umidade	55
4. Discussão	56
5. Conclusão	59
6. Referências	60
7. Conclusão Geral	64

Lista de Tabelas

Tabela 1: Variáveis independentes e níveis de fatores com valores reais e codificados utilizadas no RSM no delineamento Box-Behnken.....	22
Tabela 2: Matriz experimental da metodologia de superfície de resposta com valores experimentais (codificados e reais) e resultados de polifenóis totais e atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP).....	25
Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) dos modelos, coeficientes e falta de ajuste de polifenóis e atividade antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP).....	26
Tabela 4: Coeficientes de regressão do modelo para conteúdo total de Polifenóis e atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP).....	27
Tabela 1: Ingredientes e composição centesimal das dietas experimentais suplementadas com extrato de folhas de Mstruz.....	47

Lista de Figuras

Figura 1: Mestruz (<i>Coronopus didymus</i>)	12
Figura 1: Superfícies de respostas do conteúdo total de polifenóis: (A) Solvente-massa e álcool, (B) concentração de álcool e temperatura, (C) solvente-massa, temperatura e DPPH (D) álcool e solvente-massa, (E) temperatura e álcool (F) solvente-massa, temperatura e ABTS: (G) solvente –massa e álcool, (H) temperatura e álcool, (I) temperatura, solvente-massa e FRAP: (J) solvente-massa e álcool (K) temperatura e álcool (L) solvente-massa e temperatura.....	31
Figura 2: Microplaca 96 poços.....	32
Figura 1: Concentração de malondialdeído (MDA) ao longo do tempo de armazenamento. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos dentro de cada semana ($p < 0,05$).51	51
Figura 2: Níveis de peroxidação lipídica (expressos como equivalentes de MDA) em função da concentração de extratos equivalente a mg/kg de BHT e 100mg/kg BHT na ração de peixe durante a 4ª semana de armazenamento. Linha pontuada azul representa a média obtida pelo tratamento com 100 mg/Kg de BHT. Linha pontuada vermelha indica a tendência/ regressão linear, que mostra como os valores de MDA mudam à medida que a concentração de equivalentes de BHT (mg/kg) aumenta.....	52
Figura 3: Determinação dos polifenóis ao longo do tempo de armazenamento. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$).....	53
Figura 4: Atividade antioxidante (DPPH) ao longo do tempo de armazenamento. As barras representam as médias de cada tratamento com o desvio padrão. Letras iguais indicam que não houve diferenças entre os tratamentos dentro de cada semana ($p > 0,05$).....	54
Figura 5: Atividade antioxidante (ABTS) ao longo do tempo de armazenamento. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos dentro de cada semana ($p < 0,05$).....	55

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação às pessoas que tanto se dedicam a mim: aos meus pais, **Zefanias Fujuca Baloi** em memória e **Rameca Machava**, a minha esposa **Zerina Domingos Mulambo Baloi**, aos meus filhos **Ildo**, **Dorcília** e **Nicolly Baloi** e aos meus irmãos. Vocês são a “**minha riqueza**”. Que possamos juntos continuar nos apoiando mutuamente no caminho da vida.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus, onipotente e onipresente, pelo dom precioso da vida, por me conceder a graça de vivenciar momentos de aprendizado e crescimento. Sua presença e força foram minha base em todos os momentos, me permitindo enfrentar os desafios e celebrar as conquistas.

Agradeço profundamente à minha família, que esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, incentivando e oferecendo amor incondicional. Cada um de vocês teve um papel único e especial nessa jornada. Não tenho palavras suficientes para expressar minha gratidão.

A minha esposa, Zerina Domingos Mulambo Baloi, agradeço profundamente pelo amor, carinho e compreensão ao longo de todo o processo. Sua presença constante foi um suporte inestimável em todos os momentos, e suas palavras de incentivo me deram forças para seguir em frente.

Aos meus filhos, agradeço pela paciência que tiveram. Não foi fácil, pois os abandonei por todo esse período, mas, mesmo assim, vocês sempre ligavam para saber como estava a vida do pai e quando eu poderia voltar para casa. Suas demonstrações de carinho me motivaram e me deram forças para continuar.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins, sou profundamente grato pela orientação dedicada e paciente ao longo deste caminho. Seu apoio, confiança e sabedoria foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Borges Tesser, agradeço pela confiança depositada, pelas conversas enriquecedoras e pelos conselhos que sempre me direcionaram com clareza e gentileza, e sua disposição em contribuir para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Estendo meu agradecimento a todos os professores do programa, sou eternamente grato pelo ensino inspirador e pelo exemplo de dedicação e excelência que sempre demonstraram. Cada um de vocês, com seus conhecimentos e experiências, foi parte essencial na minha formação, e certamente carregarei os ensinamentos que me proporcionaram por toda a vida.

Agradeço aos queridos Dr. Juan Rafael Buitrago Ramirez e Msc. Robson Matheus Marreiro Gomes, que de alguma forma contribuíram imensamente com seus esforços desde o planejamento, análise e realização de todo o trabalho, além dos valiosos ensinamentos. Meu muito obrigado a vocês!

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos sobre o manejo dos equipamentos e pela clareza nas dúvidas que tive durante a realização do trabalho.

Agradeço à Msc. Thaise Dalphert pelos ensinamentos no manejo dos equipamentos do Laboratório de Nutrição dos Organismos Aquáticos (LANOA).

Agradeço aos meus compatriotas Msc. José Artur, Msc. Navinésia e Priscidonia pelo apoio incondicional que me deram durante minha estadia em Rio Grande e ao longo da minha formação.

Agradeço aos colegas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Cada palavra de incentivo, troca de experiência e ato de apoio teve um impacto significativo nessa jornada e tornou essa trajetória mais leve, significativa e gratificante.

Agradeço a FURG, e ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura pela oportunidade de formação profissional.

Agradeço ao Grupo de Cooperação Internacional de Universidades Brasileiras (GCUB) pela oportunidade concedida de cursar o mestrado em Aquicultura através do seu programa de mobilidade internacional. A seleção para este programa foi fundamental para o avanço da minha formação acadêmica, e sou grato pelo suporte e confiança depositada em mim.

Por fim, agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa e pelo desenvolvimento da ciência Moçambicana.

Resumo Geral

A aquicultura desempenha papel essencial na segurança alimentar global, fornecendo proteína de alta qualidade, com produção que supera métodos tradicionais de pesca. Contudo, desafios como surtos de doenças e a oxidação lipídica em rações comprometem a qualidade nutricional e a saúde dos peixes. O uso de antioxidantes naturais, como compostos bioativos extraídos das folhas de *Coronopus didymus* (Mestruz), surge como uma alternativa sustentável. As folhas de Mestruz são ricas em proteínas, minerais e compostos antioxidantes, anti-inflamatórios e antifúngicos. Este estudo teve como objetivo otimizar a extração de compostos bioativos das folhas de Mestruz e avaliar sua aplicação na estabilidade e qualidade das rações durante o armazenamento, reduzindo a peroxidação lipídica e melhorando o desempenho nutricional das dietas.

Palavras chave: Aquicultura, oxidação lipídica, rações

Abstract

Aquaculture plays a critical role in global food security by providing high-quality protein, with production surpassing traditional fishing methods. However, the sector faces challenges such as disease outbreaks and lipid oxidation in fish feed, which compromise nutritional quality and animal health. To address these issues, the use of natural antioxidants, like bioactive compounds extracted from *Coronopus didymus* (Mestruz), has emerged as a sustainable alternative. Mestruz leaves are rich in proteins, minerals, and bioactive compounds with antioxidant, anti-inflammatory, and antifungal properties. This study aimed to optimize the extraction process of bioactive compounds from Mestruz leaves and evaluate their effect on feed stability and quality during storage, mitigating lipid peroxidation and improving the nutritional performance of fish diets.

Key words: Aquaculture, Lipid oxidation, feeds

1 1. Introdução Geral

2 A aquicultura desempenha um papel fundamental na segurança alimentar global,
3 contribuindo significativamente para o fornecimento de proteína animal de alta qualidade
4 (Pradeepkiran, 2019). De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2024), a
5 produção global da aquicultura e pesca atingiu um novo recorde em 2022 com 223,2 milhões
6 de toneladas produzidas/capturadas, um aumento de 4,4% em relação a 2020. Desse total, a
7 aquicultura se destacou com 130,9 milhões de toneladas, das quais 94,4 milhões de toneladas
8 foram de animais aquáticos. Isso significa que, pela primeira vez, a aquicultura superou a pesca,
9 que capturou 92,3 milhões de toneladas em 2022.

10 Com a intensificação da produção, os sistemas de cultivo tornam-se mais suscetíveis a
11 surtos de patógenos, que afetam a saúde e o bem-estar dos peixes e, conseqüentemente, a
12 viabilidade econômica da aquicultura (Pereira et al., 2021). Apesar do crescimento da
13 aquicultura, o setor enfrenta desafios significativos, como o controle de doenças e a
14 implementação de estratégias para a prevenção e manutenção da saúde dos peixes em sistemas
15 de produção (Assefa & Abunna, 2018). Tradicionalmente, antioxidantes sintéticos têm sido
16 amplamente utilizados para combater o estresse oxidativo e reduzir a incidência de doenças
17 (Ventola, 2015). No entanto, o uso contínuo desses compostos traz preocupações quanto aos
18 seus potenciais efeitos adversos, e portanto, surge o interesse por alternativas naturais mais
19 seguras e sustentáveis, como o uso de plantas bioativas (Dawood et al., 2017). Uma dessas
20 plantas promissoras é a Mestruz (*Coronopus didymus*), cujas propriedades benéficas podem
21 oferecer soluções potenciais para esses desafios.



22

23 Figura 1: Mestruz (*Coronopus didymus*). Fonte: Horto Didático de plantas medicinais do
24 HU/CCS.

25 No Brasil, a *Coronopus didymus* (L.) Smith (Brassicaceae), é popularmente conhecida como
26 “mentruz ou mastruço” ou “mentruz-rasteiro” (Lorenzi e Matos, 2002). Esta planta cresce
27 espontaneamente em hortas, pastagens e em áreas de cultivo, principalmente no inverno.
28 Considerada uma planta invasora, possui um sabor marcante semelhante ao agrião e é originária
29 da América do Sul, com presença predominante nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. A planta,
30 quando fresca, costuma ser consumida em saladas ou amassada e misturada à cachaça, sendo
31 usada tanto em cataplasmas quanto ingerida como remédio (Noreen et al., 2017). Suas
32 aplicações medicinais incluem a purificação do sangue, alívio de catarro, tratamento de tosse,
33 bronquite, infecções virais, artrose, reumatismo, além de problemas gástricos, urinários, dores
34 musculares, hematomas, traumas, feridas e úlceras externas. Esta também possui propriedades
35 cicatrizantes, anti-inflamatórias, anticâncer e antifúngico (Busnardo et al., 2010).

36 As folhas de Mestruz são consideradas uma fonte promissora de nutrientes para a
37 alimentação animal, devido à sua rica composição nutricional e à presença de compostos
38 bioativos estruturalmente diversos, que possuem grande potencial biomédico e farmacêutico.
39 Destacam-se pelo elevado teor de proteína (28,17%), potássio (4%), cálcio (1,2%), enxofre
40 (1,2%), fósforo (0,72%), magnésio (0,41%), sódio (0,14%), ferro (0,01%), zinco (0,0061%),
41 manganês (0,0029%), boro (0,0018%), e cobre (0,0008%), todos em base seca (Kinupp e
42 Barros, 2008). Os extratos das folhas de mestruz podem possuir propriedades antifúngicas,
43 antioxidantes, antimaláricas, antitumorais, cicatrizantes e anti-inflamatórias (Muzammil et al.,
44 2022).

45 Os extratos vegetais desempenham um papel fundamental na redução do estresse oxidativo,
46 uma condição que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a
47 capacidade antioxidante do organismo (Ogunkalu, 2019). Para maximizar e aproveitar
48 eficientemente os compostos bioativos e os benefícios dos extratos vegetais, é essencial aplicar
49 técnicas que otimizem o processo de extração desses compostos. Variáveis como concentração
50 de solvente, temperatura, relação solvente/massa entre outros, devem ser cuidadosamente
51 ajustadas para garantir a eficiência da extração e a qualidade dos compostos bioativos obtidos
52 (Giacometti et al., 2018; Jurinjak et al., 2018).

53 O fortalecimento da dieta dos peixes com antioxidantes naturais, como extratos vegetais,
54 tem se mostrado uma estratégia promissora, pois pode não apenas fornecer uma fonte adicional
55 de nutrientes, mas também potencializar a capacidade antioxidante das dietas, promovendo
56 saúde e desempenho zootécnico dos peixes (Filipe et al., 2023). A extração de antioxidantes

57 das folhas de Mestruz apresenta-se como uma estratégia promissora para aumentar a vida útil
58 das rações, reduzindo processos oxidativos e preservando a qualidade nutricional.

59 A oxidação é uma das principais causas de deterioração dos alimentos, especialmente
60 de lipídeos utilizados em rações, comprometendo sua qualidade nutricional e energética. Esse
61 processo gera alterações organolépticas, como ranço e odor desagradável, além de produzir
62 substâncias tóxicas prejudiciais à saúde animal (Baron et al., 2020). A degradação oxidativa dos
63 lipídios, conhecida como rancidez, é um dos principais problemas que comprometem a
64 qualidade da farinha e óleo do pescado durante o armazenamento. Os ácidos graxos altamente
65 insaturados presentes nos lipídios dos peixes, como o eicosapentaenoico (20:5n-3) e o
66 docosahexaenoico (22:6n-3), são especialmente vulneráveis à oxidação devido à elevada
67 quantidade de ligações duplas entre átomos de carbono em sua estrutura molecular
68 (Laohabanjong et al., 2009)

69 Este trabalho teve como objetivo otimizar a extração de compostos bioativos de folhas de
70 mestruz (*Coronopus didymus*) e avaliar sua aplicação na estabilidade durante o armazenamento
71 e nas propriedades de rações para peixes.

72 **2. Objetivos**

73 **2.1. Objetivo geral**

74 ➤ Otimizar a extração de compostos bioativos de folhas de mestruz (*Coronopus didymus*)
75 (Capítulo I) e Avaliar sua aplicação na estabilidade durante o armazenamento e nas
76 propriedades de rações para peixes (Capítulo II).

77 **2.2. Objetivos específicos**

- 78 ➤ Avaliar os efeitos de diferentes parâmetros para otimizar o processo de extração de
79 compostos bioativos das folhas de mestruz;
80 ➤ Avaliar a capacidade antimicrobiana do extrato obtido das folhas de mestruz;
81 ➤ Avaliar a eficácia do extrato de mestruz em evitar a peroxidação lipídica quando
82 incorporado em rações para peixes, assim como, sua capacidade antioxidante.

83 **3. Referências**

84 Assefa, A., & Abunna, F. (2018). Maintenance of fish health in aquaculture: review of
85 epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Veterinary*
86 *medicine international*, 2018(1), 5432497.

87 Baron, L. F., Pazinato, R., & Baron, C. P. (2020). Oxidação de lipídeos e as implicações
88 na nutrição e saúde de animais de produção. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 37(1), 265-297.

89 Borges, M.S., Freitas, M.D., Cardoso, S., Citadini, V., Bó, S.D., Amaral, P.D.A.
90 Ethnobotanical study of selected medicinal plants used for the treatment of respiratory diseases
91 in Southern Brazil. *J. Med. Plant Res.* 2021, 15, 22–34.

92 Busnardo, T. C. P. M., Padoani, C., Mora, T. C., Biavatti, M. W., Fröde, T. S., Bürger,
93 C., Souza, M. M. de. (2010). Anti-inflammatory evaluation of *Coronopus didymus* in the
94 pleurisy and paw oedema models in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 519–525.
95 doi:10.1016/j.jep.2009.12.017.

96 Dawood, M. A. O., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2017). Beneficial roles of feed
97 additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*.
98 doi:10.1111/raq.12209.

99 FAO. 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. Blue Transformation
100 in- action. Rome. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>.

101 Filipe, D., Gonçalves, M., Fernandes, H., Oliva-Teles, A., Peres, H., Belo, I., &
102 Salgado, J. M. (2023). Shelf-life performance of fish feed supplemented with bioactive extracts
103 from fermented olive mill and winery by-products. *Foods*, 12(2), 305.
104 <https://doi.org/10.3390/foods12020305>.

105 Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G.,
106 Režek Jambrak, A. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from
107 mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research*
108 *International*, 113, 245–262. doi:10.1016/j.foodres.2018.06.036.

109 Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Valinger, D., Jurina, T., Belščak-Cvitanović, A., &
110 Gajdoš Kljusurić, J. (2018). Optimizing bioactive compounds extraction from different
111 medicinal plants and prediction through nonlinear and linear models. *Industrial Crops and*
112 *Products*, 126, 449–458. doi:10.1016/j.indcrop.2018.10.040.

113 Kinupp, V. F., & Barros, I. B. I. D. (2008). Teores de proteína e minerais de espécies nativas,
114 potenciais hortaliças e frutas. *Food Science and Technology*, 28, 846-857.

115 Laohabanjong, R., Tantikitti, C., Benjakul, S., Supamattaya, K., & Boonyaratpalin, M.
116 (2009). Lipid oxidation in fish meal stored under different conditions on growth, feed efficiency
117 and hepatopancreatic cells of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 286(3-4),
118 283–289. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.09.

119 Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas.
120 Instituto Plantarum, São Paulo, pp. 189–190.

121 Noreen, H., Semmar, N., Farman, M., & McCullagh, J. S. O. (2017). Measurement of
122 total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus*
123 *didymus*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 10(8), 792–801.
124 doi:10.1016/j.apjtm.2017.07.024.

125 Ogunkalu, O. (2019). Effects of feed additives in fish feed for improvement of
126 aquaculture. Eurasian Journal of Food Science and Technology, 3(2), 49-57.

127 Pereira, M. M., Heluy, G. M., Ramos, L. R. V., & Pedrosa, V. F. (2021). Óleos
128 essenciais como aditivo em dieta para tilápia do Nilo criadas em água salinizada. in inovações
129 na nutrição animal: desafios da produção de qualidade (Vol. 1, pp. 180-197). Editora Científica
130 Digital. DOI:10.37885/210203157.

131 Pradeepkiran, J. A. (2019). Aquaculture role in global food security with nutritional
132 value: a review. Translational Animal Science, 3(2). doi:10.1093/tas/txz012.

133 Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.
134 Pharmacy and therapeutics, 40(4), 277.

135
136

137

138

CAPÍTULO 1

139

140 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS FOLHAS DE 141 MESTRUZ (*Coronopus didymus*)

142

143 Alex Zefanias Baloi ^{1,2,3}, Marcelo Borges Tesser ^{1,3}, José Maria Monserrat ^{1,4}, Juan Rafael

144 Buitrago Ramírez ^{1,4}, Robson Matheus Marreiro Gomes ^{1,4}, Daniela Fernandes Ramos^{1,5},

145 Vilásia Guimarães Martins ^{1,2}

146 1 Programa de Pós-Graduação em Aquicultura (PPGAqui), Instituto de Oceanografia (IO),

147 Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil

148 2 Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Escola de Química e Alimentos (EQA),

149 Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil

150 3 Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA), Instituto de Oceanografia (IO),

151 Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil

152 4 Laboratório de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos (BIFOA), Instituto de

153 Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil

154 5 Núcleo de Desenvolvimento de Novos Farmacos (NUDEFA), Universidade Federal do Rio

155 Grande – FURG – Rua Visconde de Paranagua, 102 – Centro, Rio Grande, Rio Grande do Sul

156 CEP 96203-900, Brazil

157

158 Artigo em preparação para submissão à revista Journal of Food Science and Technology

159

160 RESUMO

161 A Mestruz (*Coronopus didymus*) tem sido usada na medicina popular para tratar diversas

162 doenças, além de possuir propriedades antioxidantes, antimicrobianas, cicatrizantes e a

163 capacidade de remover metais pesados do ambiente. Compostos bioativos podem ser obtidos a

164 partir de fontes vegetais subaproveitadas, como cascas, flores, folhas e resíduos de frutas,

165 utilizando-se processos de extração. O objetivo deste estudo foi otimizar o processo de extração

166 de compostos ativos das folhas do mestruz. Para a otimização da extração dos compostos ativos

167 das folhas de mestruz foi aplicado um planejamento experimental do tipo Box-Behnken sendo

168 investigado os efeitos das seguintes variáveis, relação solvente-massa (10, 55 e 100 mL/g),

169 temperatura (25, 55 e 85° C) e concentração de etanol (0, 50 e 100 %) sobre o conteúdo de

170 polifenóis totais (TPC), atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) e antimicrobianas

171 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhirium*, *Vibrio*
172 *parahaemolyticus* e *Staphylococcus aureus*). Os resultados mostram que as condições ótimas
173 de extração foram alcançadas com 100 mL/g de solvente-massa, temperatura de 85°C e 44,62%
174 de álcool etílico durante 120 min. Nessas condições, o extrato obtido apresentou o maior teor
175 de polifenóis totais (15.533,33 µg EAG/g), atividades antioxidantes, DPPH (28.900,00 µM
176 ET/g), ABTS (54.900,00 µM ET/g e FRAP (126.800,00 µMET/g), e atividades antimicrobianas
177 contra *Salmonella enterica*, com uma concentração mínima inibitória de 10 mg/L, e
178 *Staphylococcus aureus*, com 20 mg/L, demonstrando o potencial do extrato das folhas de
179 mestruz como uma fonte de compostos bioativos para aplicações industriais.

180

181 **Palavras-Chave:** Metodologia de superfície de resposta, Plantas não convencionais, Extrato
182 natural, Atividades antioxidantes

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202 **1. Introdução**

203 Na indústria alimentícia, a preocupação central tem sido a preservação de alimentos,
204 principalmente para prolongar a vida útil dos produtos e manter sua qualidade sensorial e
205 nutricional (Martillanes et al., 2017). A indústria da aquicultura enfrenta atualmente um
206 grande desafio devido à deterioração da saúde e da qualidade dos peixes, causada pela
207 oxidação da ração (Yan et al., 2022). A oxidação dos lipídios nos alimentos para peixes
208 compromete não apenas as gorduras, mas também destrói vitaminas essenciais,
209 resultando em consequências negativas como crescimento lento, baixa eficiência
210 alimentar, escurecimento da pele, letargia e até mortalidade (Kop et al., 2019). Para
211 garantir uma produção sustentável e manter a saúde dos peixes em sistemas de
212 aquicultura, é essencial fornecer uma dieta completa e equilibrada (Shefat & Karim,
213 2018), que ajude a fortalecer o sistema imunológico, garantindo assim maior resistência
214 a doenças oportunistas (Syanya et al., 2023).

215 Com o objetivo de manter a qualidade das rações preservada, conservantes sintéticos
216 são incorporados, garantindo sua segurança (Rathee et al., 2023). Devido aos potenciais
217 efeitos prejudiciais dos aditivos sintéticos, setores como o de processamento e
218 conservação de alimentos, cosméticos e farmacêuticos estão buscando alternativas
219 naturais que possam substituí-los de maneira eficaz e segura (Santos e Martins, 2023;
220 Gutiérrez-del-Río et al., 2021). Isso reflete a crescente demanda por alternativas naturais
221 para substituir compostos químicos sintéticos, devido aos seus potenciais efeitos
222 negativos à saúde pública e ao meio ambiente (Borges et al., 2020). O uso de extratos
223 naturais na fabricação de rações tem aumentado nos últimos anos, pois os compostos
224 ativos, como os polifenóis, têm demonstrado propriedades antimicrobianas e
225 antioxidantes em animais de produção (Pitino et al., 2021). Além dos polifenóis, os
226 flavonoides e os terpenos, desempenham papel crucial na inibição de processos
227 oxidativos e no controle de patógenos em alimentos (Stagos, 2019). Devido à bioatividade
228 dos polifenóis, estudos têm sido realizados visando à otimização da extração de polifenóis
229 de cascas, flores, folhas, bagaço de frutas e resíduos provenientes de diversas partes
230 comestíveis e não comestíveis de plantas (Santos e Martins, 2023).

231 A Mestruz (*Coronopus didymus*) é uma espécie ervense da família Brassicaceae, é
232 originário de regiões temperadas quentes, mas adapta-se bem às subtropicais. No Brasil,
233 se distribui no Nordeste, Sudeste e Sul (Sartori et al., 2020). A planta tem sido

234 tradicionalmente utilizada no tratamento de tosse, hematomas, traumas, artrose,
235 bronquite, úlceras externas, câncer, estresse oxidativo, aliviar dores musculares,
236 minimizar febre e inflamação, purificar o sangue, além de possuir propriedades
237 antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais, cicatrizantes e anti-inflamatórias (Busnardo
238 et al., 2010). Além das propriedades terapêuticas e curativas, é relatado que possui
239 propriedade de fitorremediação para zinco, chumbo e cádmio (Muzammil et al., 2022).

240 As folhas de mestruz (*Coronopus didymus*) são consideradas fontes promissoras de
241 nutrientes para alimentação animal devido à sua composição nutricional, como alto teor
242 de proteína (28,17%) e presença de compostos bioativos diversos com potencial
243 biomédico e farmacêutico (Kinupp e Barros, 2008).

244 A extração de compostos bioativos de plantas é uma prática utilizada há séculos e
245 continua sendo um tema de grande interesse devido ao seu papel crucial na obtenção de
246 substâncias de valor terapêutico, nutricional e industrial (Lefebvre et al., 2021). Esses
247 compostos bioativos podem ser extraídos por meio de vários métodos convencionais e
248 modernos, as técnicas incluem a extração assistida por ultrassom, extração por fluido
249 supercrítico, extração acelerada por solvente, e extração assistida por micro-ondas
250 (Usman et al., 2022).

251 Entre os possíveis métodos de otimização, têm-se planejamentos experimentais
252 baseados na geração de superfícies de resposta, que estabelecem relações entre variáveis
253 que afetam um processo. A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma
254 abordagem estatística e matemática que emprega um modelo polinomial de segundo grau
255 para analisar as relações entre uma ou mais variáveis respostas e fatores independentes,
256 sendo considerada uma estratégia de otimização eficiente (Insang et al., 2021). Na
257 literatura não foram encontrados estudos referentes a otimização da extração de
258 compostos ativos a partir de folhas de mestruz, porém extratos desta planta têm sido
259 avaliados em função das suas atividades farmacológicas nos seres humanos contra
260 câncer, diabetes, bactérias infecciosas e estresse oxidativo (Muzammil et al., 2022).

261 O objetivo deste estudo foi otimizar o processo de extração de compostos ativos do
262 mestruz, investigar os efeitos das variáveis relação solvente-massa, temperatura e
263 concentração de etanol sobre o conteúdo de polifenóis totais (TPC) e as atividades
264 antioxidantes: Atividade sequestradora de radicais livres (DPPH), a capacidade de

265 eliminação de radicais livres (ABTS), a redução dos íons de ferro (FRAP) e
266 antimicrobianas.

267

268 **2. Material e Métodos**

269 **2.1.Reagentes**

270 Os reagentes Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico),
271 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TPTZ (2,4,6- Tri (2-Piridil)-s-Triazina), ABTS (
272 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), foram adquiridos da Sigma –
273 Aldrich. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

274

275 **2.2.Folhas de mestruz**

276 As folhas de mestruz (*Coronopus didymus*) foram coletadas ao redor da horta do
277 Cassino, Unidade de censitária 34, Rio Grande/RS – Brasil. As folhas foram higienizadas
278 com água e com solução de hipoclorito a 200 ppm por 10 min, desidratadas em estufas
279 com circulação e renovação de ar por 24 h a uma temperatura de 45°C. Após, foram
280 trituradas em moinho de facas (Marconi modelo MA 090) a uma malha de 60 mesh. A
281 farinha de folhas obtida foi acondicionada em sacos plásticos transparentes de polietileno
282 e armazenadas a -18°C.

283

284 **2.3.Otimização do processo de extração dos compostos ativos das folhas de** 285 **mestruz**

286 A extração dos compostos bioativos foi realizada em um agitador magnético (IKA RT
287 15) a uma rotação de 500 rpm . Utilizou-se 10, 55 e 100 mL de solvente, com diferentes
288 percentuais de etanol (0, 50 e 100%) e diversas proporções de massa foram ajustadas para
289 otimizar o processo. As misturas foram homogeneizadas em Erlenmeyers de 250 mL. O
290 processo de extração foi realizado em diferentes temperaturas (25°C, 55°C e 85°C)
291 durante 2 h. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 15.000 × g por 10 min a
292 4°C, e o sobrenadante foi coletado para a determinação do teor total de polifenóis e das
293 atividades antioxidantes.

294 O delineamento experimental Box-Behnken foi utilizado para avaliar os efeitos do
295 percentual de etanol (X1), relação solvente-massa (mL/g) (X2) e temperatura (X3) no

296 processo de extração de compostos ativos das folhas de mestruz. O desenho experimental
 297 consistiu em 15 experimentos incluindo 3 pontos centrais (Tabela 1). A otimização das
 298 variáveis independentes na extração de compostos fenólicos foi realizada pela
 299 metodologia de superfície de resposta (MSR). As respostas experimentais foram ajustadas
 300 pela equação (1) sendo esta uma equação polinomial de segunda ordem:

$$301 \quad Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

302 Onde Y é a resposta predita; β_0 é uma constante; β_i é o coeficiente linear; β_{ii} é o
 303 coeficiente quadrático; β_{ij} é o coeficiente de interação da variável i, j; X_i e X_j são as
 304 variáveis independentes. A adequação do modelo foi determinada pela avaliação do
 305 coeficiente de determinação (R^2) e pelo teste de falta de ajuste. A análise de variância
 306 (ANOVA) foi aplicada para determinar a significância do modelo, dos coeficientes e da
 307 falta de ajuste a 95% de significância ($p < 0,05$) (Tabela 3). O teste t foi realizado para
 308 determinar os efeitos dos coeficientes dos modelos (Tabela 4).

309

310 **Tabela 1:** Variáveis independentes e níveis de fatores com valores reais e codificados
 311 utilizadas no RSM no delineamento Box-Behnken.

Fatores	Variáveis	Níveis		
		-1	0	1
Concentração de etanol %	X1	0	50	100
Relação solvente massa mL/g	X2	10	55	100
Temperatura °C	X3	25	55	85

312

313 **2.4. Análise de compostos ativos dos extratos**

314 **2.4.1. Determinação do conteúdo total de polifenóis**

315 O conteúdo total de polifenóis foi determinado usando o método de Folin-Ciocalteu,
 316 conforme descrito por Waterhouse (2002), com algumas modificações. Para este fim, 15
 317 μL do extrato foi transferido para um tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 1,26 mL
 318 de reagente de Folin-Ciocalteu (10% v/v) e incubados por 8 min no escuro a temperatura
 319 ambiente (25°C). Subsequentemente, foram adicionados 225 μL de solução de carbonato
 320 de sódio (25%), e realizada uma nova incubação a temperatura ambiente (25°C) no escuro
 321 por 2 h, e então, a absorbância da amostra foi medida usando um espectrofotômetro UV-
 322 VIS (BEL M51, PRC) a 765 nm. Um padrão de ácido gálico foi usado para a curva de

323 calibração, e os valores foram expressos em microgramas de equivalentes de ácido gálico
324 (EAG) por grama de amostra (μg EAG/g de amostra).

325

326 **2.4.2. Determinação das atividades antioxidantes**

327 A atividade sequestradora de radicais livres (DPPH) foi avaliada de acordo com o
328 método descrito por Noreen et al. (2017), com algumas modificações, onde o radical
329 DPPH foi preparado com metanol absoluto na concentração de $80 \mu\text{M}$. Para a análise,
330 $1,8 \text{ mL}$ dos radicais DPPH, foram misturados com $10 \mu\text{L}$ do extrato e mantidos a
331 temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) por 30 min , para então ser realizada a leitura em
332 espectrofotômetro UV-VIS (BEL M51, PRC) a 515 nm . Um padrão Trolox foi utilizado
333 para a curva de calibração e a capacidade de eliminação contra o radical DPPH foi
334 expressa em μM equivalente de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{M TE/g}$ de amostra).

335

336 A capacidade de eliminação de radicais livres ABTS foi avaliada pelo método descrito
337 por Santos e Martins (2023) com algumas modificações. O radical ABTS foi preparado
338 após a mistura das soluções de ABTS (7 mM) e persulfato (140 mM) por 16 h . A mistura
339 foi então diluída em etanol absoluto, e o comprimento de onda foi ajustado para 734 nm
340 até que a absorbância estivesse entre $0,65$ e $0,75 \text{ nm}$, e então a amostra foi lida a 734 nm
341 em espectrofotômetro UV-VIS (BEL M51, PRC). Para a curva de calibração, 3 mL da
342 solução de ABTS foram misturados com $30 \mu\text{L}$ de extrato ou da solução padrão Trolox.
343 A solução foi deixada em repouso por 6 min e então, a absorbância foi lida a 734 nm . A
344 capacidade antioxidante do radical ABTS foi expressa em μM equivalente de Trolox por
345 grama de amostra ($\mu\text{M TE/g}$ de amostra).

346

347 A redução dos íons de ferro (FRAP) foi avaliada pelo método descrito por Rufino et
348 al. (2006), com algumas modificações. O reagente FRAP foi preparado misturando-se,
349 em um béquer de 100 mL , 5 mL de cloreto férrico 20 mM e 50 mL de tampão acetato $0,3$
350 M (155 mg de acetato de sódio em $0,8 \text{ mL}$ de ácido acético glacial, com o volume
351 completado para 50 mL , $\text{pH } 3,6$). Após a homogeneização, adicionou-se 5 mL da solução
352 de TPTZ 10 mM ($15,6 \text{ mg}$ de TPTZ em 5 mL de $\text{HCl } 40 \text{ mM}$). Para a análise, misturou-
353 se $1,5 \text{ mL}$ do reagente FRAP, com $25 \mu\text{L}$ de extrato e $175 \mu\text{L}$ de água ultrapura, incubando
354 por 30 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ no banho maria. Posteriormente, a leitura foi realizada em um

355 espectrofotômetro UV-VIS (BEL M51, PRC) a 595 nm. Um padrão de Trolox foi
356 utilizado para a curva de calibração, e os valores do ensaio FRAP foram expressos como
357 micromoles de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox por grama de amostra (μM
358 ET/g de amostra)

359

360 **2.5. Atividade Antimicrobiana**

361 A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada através da concentração inibitória
362 mínima (CIM), sendo estas determinadas utilizando o método de microdiluição sucessiva
363 em caldo em uma microplaca de poliestireno de 96 poços de acordo com o método
364 descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). A avaliação
365 antimicrobiana foi realizada utilizando as bactérias gram-negativas, *Escherichia coli*
366 (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Acinetobacter baumannii*
367 (ATCC 19606), *Salmonella typhirium* (ATCC 14028), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC
368 17802) e a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598). O extrato com
369 as melhores condições foi diluído em água nas concentrações de 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25;
370 0,625; 0,3125 mg/mL, correspondentes às diluições seriadas da ressuspensão do extrato.
371 A ciprofloxacina nas concentrações (32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5 e 0,25 mg/mL) foi usada como
372 controle de sensibilidade, e apenas o meio foi utilizado como controle negativo. Foram
373 adicionados 50 μL de caldo Mueller-Hinton (MH), nas microplacas e as concentrações
374 foram ajustadas por diluição seriada. Em seguida, 50 μL de inóculo (5×10^5 células/mL)
375 foram adicionados e incubados a 37°C por 24 h. A resazurina foi utilizada como indicador
376 colorimétrico da CIM. Após o período de incubação, 15 μL de resazurina a 0,02% foram
377 adicionados e incubados novamente por 1 h. A cor rosa indica atividade metabólica,
378 enquanto a cor azul indica que não houve atividade metabólica (Ramos and Bartolomeu
379 Halicki, 2022).

380

381 **3. Resultados**

382 **3.1. Determinação e validação de modelos**

383 Os resultados obtidos no planejamento experimental de polifenóis totais, DPPH,
384 ABTS e FRAP, estão apresentados na Tabela 2. O maior valor para o TPC foi obtido no
385 ensaio 8 (15.533,33 μg de ácido gálico/g) e o menor valor foi obtido no ensaio 10

386 (3.536,04 μg de ácido gálico/g). Para o DPPH o valor máximo de capacidade de
 387 eliminação foi obtido no ensaio 8 com (28.900 ($\mu\text{M TE/g}$ de amostra) e o menor valor foi
 388 obtido no ensaio 3 (5.050 $\mu\text{M TE/g}$ de amostra). Para o radical ABTS, o ensaio 8
 389 apresentou a maior capacidade de eliminação (54.900 $\mu\text{M TE/g}$ de amostra) e o menor
 390 valor foi obtido no ensaio 3 (14.867,50 $\mu\text{M TE/g}$ de amostra). Para FRAP, o ensaio 8
 391 apresentou a maior atividade (126.800,00 $\mu\text{M TE/g}$ de amostra) e o menor valor foi obtido
 392 no ensaio 1 (25.014,00 $\mu\text{M TE/g}$ de amostra). A relação solvente-soluto para polifenóis
 393 totais apresentou coeficiente quadrático negativo significativo ($p < 0,05$), e os coeficientes
 394 lineares para polifenóis totais, DPPH, ABTS e FRAP foram significativos ($p < 0,05$),
 395 exceto a temperatura para FRAP. A relação solvente-massa e a concentração de etanol
 396 tiveram efeitos negativos, enquanto a temperatura apresentou um efeito positivo. A
 397 interação entre concentração de álcool x temperatura foi significativa para TPC. A
 398 interação álcool x solvente-massa e álcool x temperatura para a análise de FRAP foram
 399 significativas Tabela 3 e 4.

400 Os resultados da ANOVA indicaram que os modelos de regressão foram
 401 significativos ($p < 0,05$) tanto para o polifenol total quanto para as atividades
 402 antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) Tabela 3. A análise de falta de ajuste não foi
 403 significativa indicando que os dados experimentais se ajustam bem ao modelo.

404 **Tabela 2:** Matriz experimental da metodologia de superfície de resposta com valores
 405 experimentais (codificados e reais) e resultados de polifenóis totais e atividades
 406 antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP).

Ensaio	Concentração etanol (X_1)	Relação solvente – massa (ml/g) (X_2)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (X_3)	TPC (μg EAG/g)	DPPH (μM ET/g)	ABTS ($\mu\text{M ET/g}$)	FRAP ($\mu\text{M ET/g}$)
1	0 (-1)	10 (-1)	55(0)	9.000,42	14.012,50	18.035,00	25.014,00
2	0 (-1)	100 (+1)	55(0)	6.983,33	20.975,00	39.550,00	97.133,33
3	100 (+1)	10 (-1)	55(0)	5.000,00	5.050,00	14.867,50	27.613,33
4	100(+1)	100 (+1)	55(0)	4.408,33	12.050,00	30.825,00	61.133,33
5	50(0)	10 (-1)	25(-1)	10.821,25	16.645,00	26.117,50	63.013,33
6	50(0)	10 (-1)	85(+1)	12.719,17	21.025,00	25.657,50	65.080,00
7	50(0)	100(+1)	25 (-1)	12.475,00	27.250,00	47.475,00	117.800,00
8	50(0)	100(+1)	85(+1)	15.533,33	28.900,00	54.900,00	126.800,00
9	0(-1)	55 (0)	25(-1)	10.855,63	16.431,25	31.707,50	87.340,00
10	100 (+1)	55 (0)	25(-1)	3.536,04	7.301,25	15.097,50	38.023,33

11	0 (-1)	55 (0)	85(+1)	10.191,04	18.645,00	42.047,50	68.456,67
12	100 (+1)	55 (0)	85(+1)	8.497,50	12.045,00	30.181,25	57.090,00
13	50 (0)	55 (0)	55(0)	14.998,96	24.048,75	42.528,75	110.073,33
14	50 (0)	55 (0)	55(0)	15.228,13	22.701,25	44.137,50	105.123,33
15	50 (0)	55 (0)	55(0)	13.965,42	20.693,75	45.086,25	122.356,67

407

408 **Tabela 3:** Análise de variância (ANOVA) dos modelos, coeficientes e falta de ajuste de
 409 polifenóis e atividade antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP).

Variáveis	G. Liberdade	S. Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F	valor-p
Polifenóis Totais					
X ₁	1	30375329	30375329	27.5752	0.0008
X ₂	1	432063	432063	0.3922	0.5486
X ₃	1	10702540	10702540	9.7159	0.0143
X ₁₃	1	7913086	7913086	7.1836	0.0279
X ₁ ²	1	157072920	157072920	142.5931	<,0001
X ₂ ²	1	13209645	13209645	11.9919	0.0085
Modelo	6	214038196	35673033	32.3845	<,0001
Falta de Ajuste	6	7907317.6	1317886	2.9123	0.2775
Erro Puro	2	905052.7	452526		
Erro	8	8812370	1101546.3		
C. Total	14	222850566			
R ² = 0.96					
R ² adj = 0.9959					
DPPH					
X ₁	1	141267038	141267038	96.0232	<,0001
X ₂	1	131564476	131564476	89.4281	<,0001
X ₃	1	21084395	21084395	14.3317	0.0036
X ₁ ²	1	353004538	353004538	239.9471	<,0001
Modelo	4	646920446	161730112	109.9325	<,0001
Falta de Ajuste	8	9011155	1126394	0.3952	0.8592
Erro Puro	2	5700613	2850306		
Erro	10	14711768	1471176.8		
C. Total	14	661632214			
R ² = 0.98					
R ² adj = 0.9914					
ABTS					
X ₁	1	203704497	203704497	13.8199	0.0048
X ₂	1	969595657	969595657	65.78	<,0001
X ₃	1	131128891	131128891	8.8961	0.0154

X ₁ ²	1	665263195	665263195	45.1332	<,0001
X ₂ ²	1	78734813	78734813	5.3416	0.0461
Modelo	5	2019379702	403875940	27.4	<,0001
Falta de Ajuste	7	129316818	18473831	11.0522	0.0855
Erro Puro	2	3343003	1671501.6		
Erro	9	132659821	14739980		
C. Total	14	2152039523			
R ² = 0.94					
R ² adj = 0.9984					

FRAP

X ₁	1	1106474882	1106474882	20.7862	0.0026
X ₂	1	6168605664	6168605664	115.8832	<,0001
X ₃	1	15820312.5	15820312.5	0.2972	0.6026
X ₁₂	1	372477133	372477133	6.9973	0.0332
X ₁₃	1	360050625	360050625	6.7639	0.0354
X ₁ ²	1	7441682504	7441682504	139.7992	<,0001
X ₂ ²	1	761125823	761125823	14.2985	0.0069
Modelo	7	1.59E+10	2.28E+09	42.7423	<,0001
Falta de Ajuste	5	215161833	43032367	0.5466	0.7466
Erro Puro	2	157456853	78728427		
Erro	7	372618686	53231241		
C. Total	14	1.63E+10			
R ² = 0.98					
R ² adj = 0.9903					

410 X₁, X₂, e X₃ representam as variáveis, concentração de etanol (%), relação solvente/massa (mL/g), e
411 temperatura (°C), respectivamente. A variável X₁² é o coeficiente quadrático de concentração de etanol (%),
412 e X₂² é o coeficiente quadrático da relação solvente/massa (mL/g). As variáveis X₁₂ e X₁₃ são os termos de
413 interação concentração de etanol × solvente/massa e concentração de etanol × temperatura,
414 respectivamente.

415 **Tabela 4:** Coeficientes de regressão do modelo para conteúdo total de polifenóis e
416 atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP).

Modelo	Variáveis	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Valor t	valor-p
Polifenóis Totais					
	X ₀	14754.952	504.1855	29.26	<,0001
	X ₁	-1948.568	371.0705	-5.25	0.0008
	X ₂	232.39583	371.0705	0.63	0.5486
	X ₃	1156.6406	371.0705	3.12	0.0143
	X ₁₃	1406.5104	524.7729	2.68	0.0279
	X ₁ ²	-6502.989	544.5825	-11.94	<,0001

	X_2^2	-1885.853	544.5825	-3.46	0.0085
--	---------	-----------	----------	-------	--------

DPPH

	X_0	23037.679	458.441	50.25	<,0001
	X_1	-4202.188	428.8322	-9.8	<,0001
	X_2	4055.3125	428.8322	9.46	<,0001
	X_3	1623.4375	428.8322	3.79	0.0036
	X_1^2	-9723.929	627.7461	-15.49	<,0001

ABTS

	X_0	43474.135	1844.325	23.57	<,0001
	X_1	-5046.094	1357.386	-3.72	0.0048
	X_2	11009.063	1357.386	8.11	<,0001
	X_3	4048.5938	1357.386	2.98	0.0154
	X_1^2	-13383.17	1992.098	-6.72	<,0001
	X_2^2	-4604.111	1992.098	-2.31	0.0461

FRAP

	X_0	109643.79	3504.873	31.28	<,0001
	X_1	-11760.5	2579.516	-4.56	0.0026
	X_2	27768.25	2579.516	10.76	<,0001
	X_3	1406.25	2579.516	0.55	0.6026
	X_{12}	-9649.833	3647.987	-2.65	0.0332
	X_{13}	9487.5	3647.987	2.6	0.0354
	X_1^2	-44760.81	3785.695	-11.82	<,0001
	X_2^2	-14314.97	3785.695	-3.78	0.0069

417 Variável X_0 é o intercepto e X_1 , X_2 , e X_3 representam as variáveis concentração de etanol (%), relação
 418 solvente/massa (mL/g), temperatura (°C) respectivamente. A variável X_1^2 é o coeficiente quadrático de
 419 concentração de etanol (%), X_2^2 é o coeficiente quadrático da relação solvente/massa (mL/g). As variáveis
 420 X_{12} , X_{13} são os termos de interação concentração de etanol × solvente/massa e concentração de etanol ×
 421 temperatura respectivamente.

422

423 Os modelos estimados para o teor total de polifenóis, DPPH, ABTS e FRAP estão
 424 descritos nas Equações 2, 3, 4 e 5:

425

426 $TPC (\mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}) = 14.754,952 - 1.948,568 X_1 + 232,39583 X_2 + 1.156,6406 X_3 +$
 427 $1.406,5104 X_{13} - 6.502,989 X_1^2 - 1.885,853 X_2^2$ (2)

428

429 Onde X_1 é a concentração de etanol, X_2 é a razão solvente-massa, X_3 é a
430 temperatura, X_{13} é a interação entre concentração de etanol e temperatura, X_1^2 o termo
431 quadrático de concentração de etanol e X_2^2 o termo quadrático de razão solvente-massa.
432 O modelo obtido foi significativo ($p < 0,05$), demonstrando uma relação quadrática, linear
433 e de interação entre o teor de polifenóis totais e as variáveis independentes no processo
434 de extração. O coeficiente de determinação foi considerado alto ($R^2 = 0,96$), como
435 mostrado graficamente pela dispersão dos dados observados em relação aos previstos
436 (Figuras 1A, 1B e 1C). Interações significativas foram plotadas em gráficos
437 tridimensionais de superfície de resposta. A Figura 1B mostra a interação entre a
438 concentração de etanol e a temperatura, demonstrando um efeito positivo da temperatura
439 e efeito negativo quadrático da concentração de etanol. Os melhores resultados foram
440 obtidos a 85 °C com 44,62 % de etanol e relação solvente-massa 100 mL/g. As Figuras
441 1A, 1B e 1C indicam a existência de pontos ótimos dentro do intervalo de estudo.

442

443 Para o DPPH, o modelo estimado foi o seguinte:

444

$$445 \text{ DPPH } (\mu\text{M ET/g}) = 23.037,679 - 4.202,188X_1 + 4.055,3125X_2 + 1623,4375X_3 - \\ 446 9.723,929X_1^2 \quad (3)$$

447 Onde X_1 representa a concentração de etanol, X_2 a razão solvente-massa, X_3 a
448 temperatura, e X_1^2 o termo quadrático da concentração de etanol. O modelo obtido foi
449 significativo ($p < 0,05$), demonstrando uma relação quadrática para concentração de
450 etanol e linear na razão solvente-massa e temperatura. O coeficiente de determinação foi
451 considerado alto ($R^2 = 0,98$), como mostrado graficamente nas Figuras 1D, 1E e 1F, os
452 melhores resultados foram encontrados com 44,62% de etanol, uma razão relação
453 solvente-massa 100 mL/g e a uma temperatura de 85°C. As Figuras 1D e 1E apresentaram
454 curvatura, enquanto a Figura F exibiu comportamento linear devido ao coeficiente
455 positivo associado à temperatura.

456

457 Para a capacidade de eliminação da ABTS, o modelo estimado foi o seguinte:

458

$$459 \text{ ABTS } (\mu\text{M ET/g}) = 43.474,135 - 5.046.094X_1 + 11.009,063X_2 + 4.048,5938X_3 - \\ 460 1.3383,17 X_1^2 - 4.604,111X_2^2 \quad (4)$$

461 Onde X_1 é a concentração de etanol, X_2 é a razão solvente-massa, X_3 é a
462 temperatura, X_1^2 o termo quadrático de concentração de etanol e X_2^2 o termo quadrático
463 de razão solvente-massa. O modelo obtido foi significativo ($p < 0,05$), demonstrando uma
464 relação quadrática e linear entre as variáveis independentes no processo de extração. O
465 coeficiente de determinação foi considerado alto ($R^2 = 0,94$). Os melhores resultados
466 foram obtidos a 85°C com 44,62% de etanol e relação solvente-massa 100 mL/g como
467 pode-se observar nas Figuras 1G, 1H e 1I.

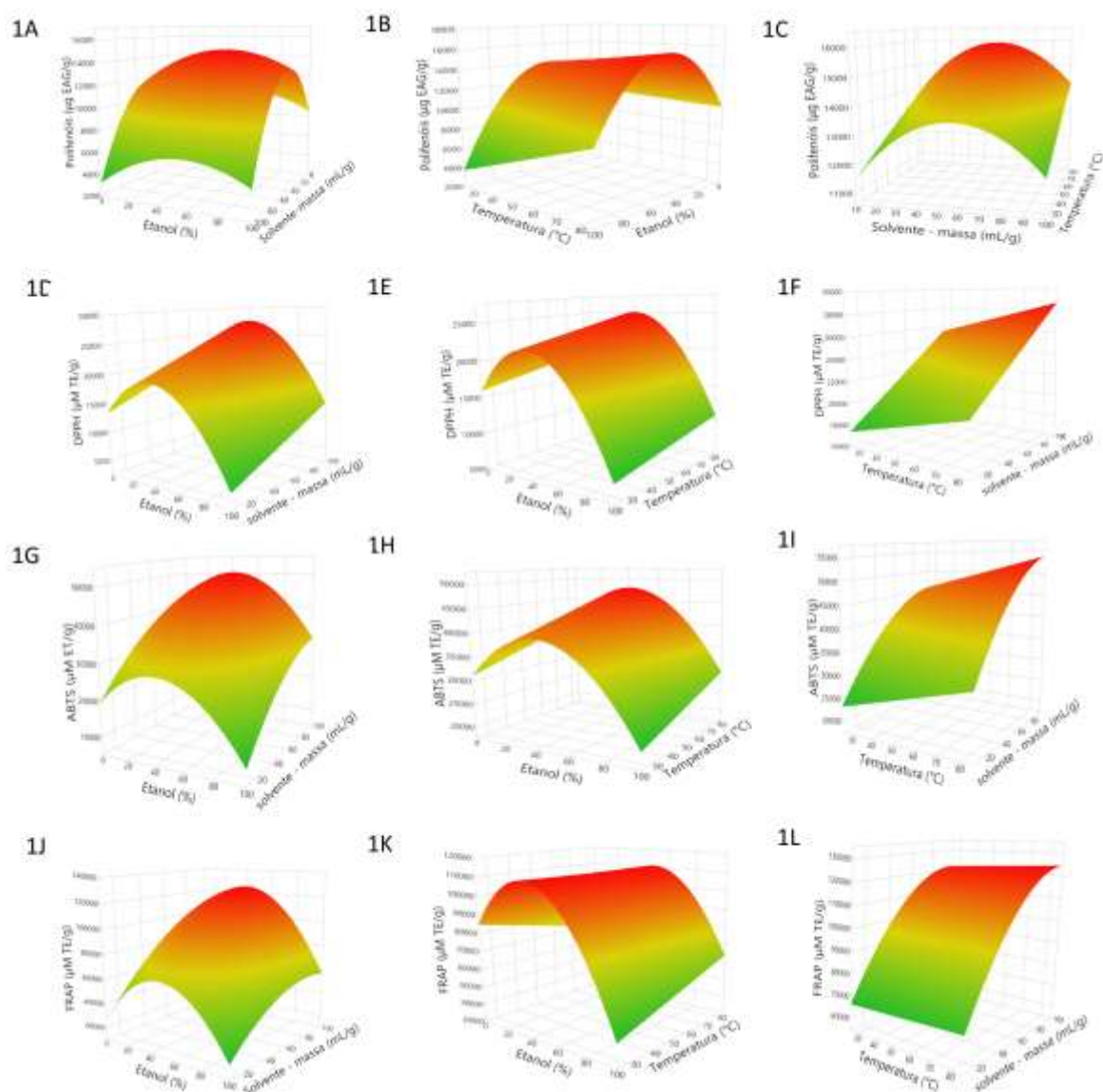
468

469 Para a redução dos íons de ferro (FRAP), o modelo estimado foi o seguinte:

470

$$471 \text{FRAP } (\mu\text{MET/g}) = 10.9643,79 - 11.760,5 X_1 + 27.768,25 X_2 + 1.406,25 X_3 - 9.649,833 \\ 472 X_{12} + 9.487,5 X_{13} - 44.760,81 X_1^2 - 14.314,97 X_2^2 \quad (5)$$

473 Onde X_1 é a concentração de etanol, X_2 é a razão solvente-massa, X_3 é a
474 temperatura, X_{12} é a interação entre concentração de etanol e a razão solvente-massa, X_{13}
475 é a interação entre a concentração de etanol e temperatura, X_1^2 o termo quadrático de
476 concentração de etanol e X_2^2 o termo quadrático de razão solvente-massa. O modelo foi
477 significativo ($p < 0,05$), mostrando relação linear em todas as variáveis independentes,
478 demonstrando uma relação quadrática e uma interação. O coeficiente de determinação foi
479 de $R^2 = 0,98$.



480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

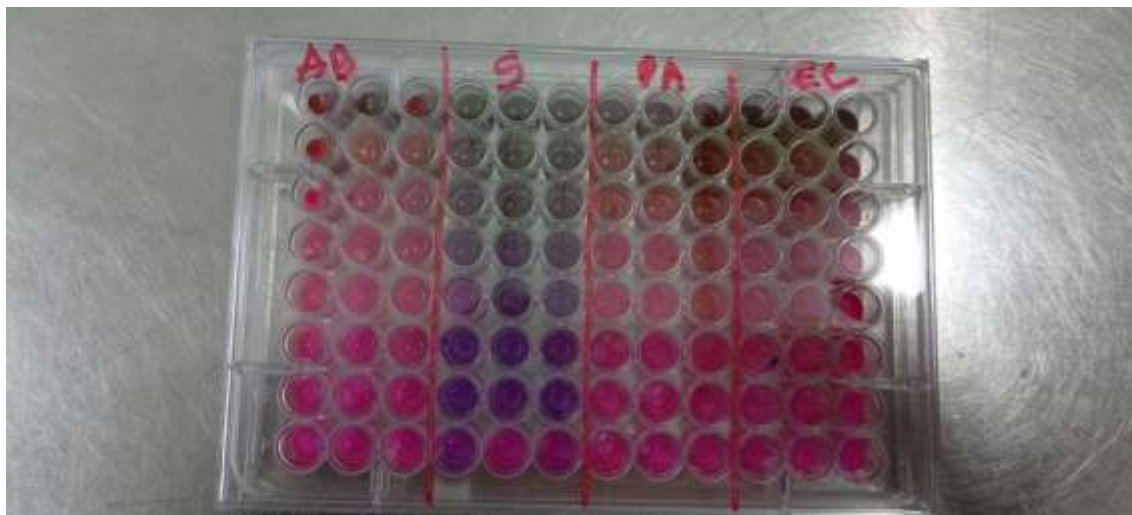
490

Figura 1 Superfícies de respostas do conteúdo total de polifenóis: (A) Solvente-massa e álcool, (B) concentração de álcool e temperatura, (C) solvente-massa, temperatura e DPPH (D) álcool e solvente-massa, (E) temperatura e álcool (F) solvente-massa, temperatura e ABTS: (G) solvente -massa e álcool, (H) temperatura e álcool, (I) temperatura, solvente-massa e FRAP: (J) solvente-massa e álcool (K) temperatura e álcool (L) solvente-massa e temperatura.

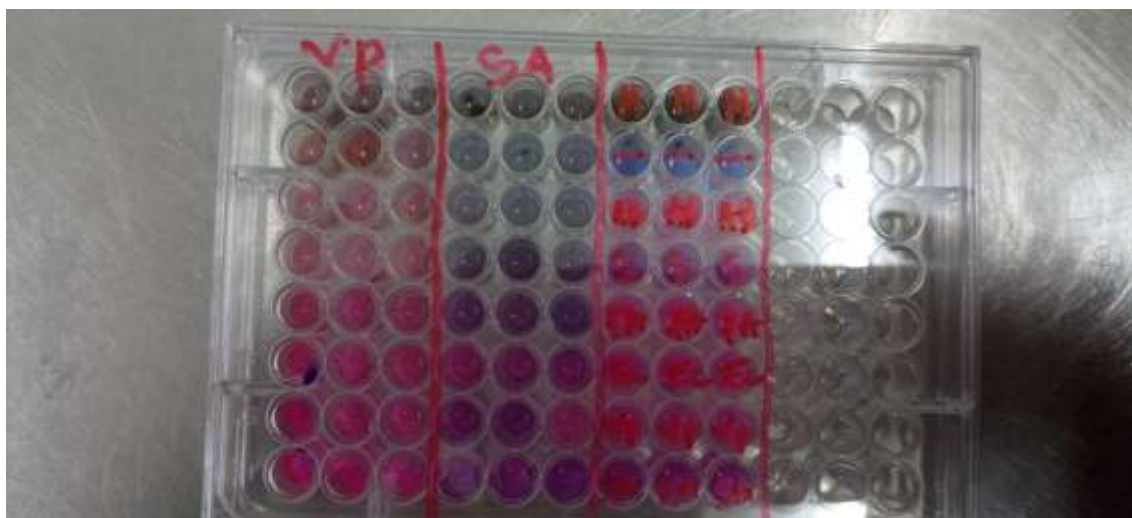
3.2. Atividades antimicrobianas

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) do extrato de *Coronopus didymus* foram testadas contra as cepas *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*

491 *aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Vibrio sp.* e *Staphylococcus aureus*. Os extratos
492 mostraram ação antibacteriana contra *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*,
493 com CIM de 10 mg/L e 20 mg/L, respectivamente. Para as demais cepas, não foi
494 observada atividade antibacteriana.
495



496
497



498
499
500
501
502

Figura 2: Microplaca 96 poços. Fonte: Arquivo pessoal.

503 **4. Discussão**

504 Elevados teores de polifenóis, foram encontrados em temperaturas mais altas e
505 com tempo prolongado de extração. Isso indica que temperaturas elevadas podem
506 melhorar a extração dos compostos bioativos (Basilio-Cortes et al., 2023). A melhora na
507 extração pode ser atribuída ao aumento na solubilidade dos compostos, à diminuição da
508 viscosidade do solvente e à maior difusão dos solutos, resultando em uma maior eficiência
509 na extração dos compostos desejados (Gomes et al., 2024). Além disso, quando expostos
510 a altas temperaturas, os tecidos vegetais se tornam macios e contribuem para o aumento
511 da permeabilidade da membrana celular, aumentando assim as interações, facilitando a
512 extração dos compostos fenólicos para o solvente (Che Sulaiman et al., 2017). Outros
513 estudos sugerem que o aumento da temperatura pode ser benéfico e melhora a extração
514 até um certo nível, pois a exposição a temperaturas elevadas pode levar à degradação dos
515 compostos (Santos e Martins, 2023; Gam et al., 2020). Na extração de *Moringa oleifera*,
516 a otimização foi alcançada quando a temperatura atingiu 158°C em 20 min (Rodríguez-
517 Pérez et al., 2016), corroborando com outros estudos que afirmam que o aumento da
518 temperatura melhora a eficiência da extração. Quando a temperatura de extração, a
519 concentração de etanol e o tempo ultrapassarem seus pontos ótimos, a extração dos
520 compostos fenólicos diminui (Gam et al., 2020). A resposta dos compostos fenólicos à
521 temperatura, tempo, relação solvente/massa e percentual de álcool varia conforme a fonte
522 vegetal (Shi et al., 2022). Por isso, as condições ideais de extração devem ser ajustadas
523 para cada amostra em específico.

524 A temperatura teve um efeito linear positivo na atividade sequestradora de radicais
525 DPPH, eliminação de radicais (ABTS) e no ensaio de poder antioxidante redutor férrico
526 (FRAP). Quando o coeficiente é positivo, significa que um aumento no nível da variável
527 leva a uma resposta maior. Por outro lado, um coeficiente negativo indica que, ao
528 aumentar a variável, a resposta diminui (Santos e Martins, 2023). O aumento da
529 temperatura pode melhorar a solubilidade, difusividade e transferência de massa dos
530 compostos antioxidantes, mas temperaturas excessivas podem causar a degradação desses
531 compostos (Gomes et al 2024).

532 O tempo de extração pode ser um fator crucial na determinação do rendimento de
533 polifenóis durante o processo de extração. Amendola et al. (2010) observaram que a maior
534 eficiência na extração de polifenóis do bagaço de uva é alcançada após 120 min de

535 extração. Estudos mostram que, à medida que o tempo de extração aumenta, a quantidade
536 de polifenóis extraída tende a aumentar também (Mokrani & Madani, 2016). Isso é
537 explicado devido à difusão e ao equilíbrio que se estabelece entre a matriz sólida e o
538 solvente favorecendo a liberação dos compostos bioativos (Che Sulaiman et al., 2017).

539 O uso de uma combinação de solventes polares e menos polares (como água e
540 etanol) é eficaz para a extração de uma ampla gama de compostos, otimizando a
541 recuperação tanto de compostos polares quanto apolares (Alara et al., 2018). A eficácia
542 do processo de extração e a recuperação dos compostos bioativos está principalmente
543 relacionada à polaridade dos solventes, pois esta determina a seletividade do sistema de
544 partição (Nguyen et al., 2023; Boeing et al., 2014). A atividade sequestradora do radical
545 (DPPH), eliminação de radical (ABTS), e ensaio de poder antioxidante redutor férrico
546 (FRAP) no extrato de mestruz (*Coronopus didymus*) mostrou um efeito linear e
547 quadrático negativo em relação ao percentual de álcool. À medida que a concentração de
548 álcool aumentou de 0 a 50%, a atividade antioxidante também aumentou, no entanto, ao
549 ultrapassar 50%, a atividade começou a diminuir, como está ilustrado na (Tabela 2). Isto
550 pode ser influenciado por dissolução de compostos polares e não polares. Comportamento
551 semelhante foi observado para as folhas de *Orthosiphon stamineus*, onde se avaliou a
552 concentração de etanol de 0 a 100%. A extração foi otimizada com 40% de etanol por 120
553 min a 65 °C, o que indica que, à medida que a concentração de etanol aumentou de 0 a
554 40%, a atividade antioxidante também aumentou; no entanto, ao ultrapassar 40%, a
555 atividade começou a diminuir (Chew et al., 2011). Por outro lado, na microalga
556 *Tetraselmis* sp., o rendimento da extração aumentou com a concentração de etanol até
557 58,3%, mas começou a diminuir em concentrações superiores (Gam et al., 2020).

558 A razão solvente-massa teve um efeito linear positivo no DPPH, ABTS e FRAP, mas
559 um efeito quadrático negativo no ABTS e FRAP. Isso pode ser explicado pelo aumento
560 da capacidade do solvente em extrair compostos bioativos à medida que a concentração
561 de etanol aumenta. No entanto, após atingir um valor ótimo, essa eficiência começa a
562 diminuir, pois a diluição do solvente consome mais álcool, reduzindo sua eficácia.
563 Resultados similares foram encontrados nos extratos de *Helicteres hirsuta* Lour, onde foi
564 observado um aumento na capacidade antioxidante com a concentração variando de 1
565 g/100 mL para 3 g/100 mL (Pham et al., 2017).

566 Dentre os microrganismos testados, houve ação antimicrobiana contra *Salmonella*
567 *enterica* e *Staphylococcus aureus*. Os extratos podem conter uma mistura de compostos
568 bioativos, como polifenóis, flavonoides e outros fitoquímicos, que podem ser mais
569 eficazes contra alguns micro-organismos específicos. Segundo Santos e Martins (2023),
570 a atividade antimicrobiana dos extratos ricos em polifenóis se deve à presença de grupos
571 hidroxila na estrutura dos compostos fenólicos que possuem a capacidade de interagir
572 com as membranas celulares dos microrganismos, causando danos estruturais,
573 desnaturação de proteínas e inibição de enzimas essenciais para o metabolismo
574 microbiano. De acordo com Muzammil et al. (2022), os extratos de *Coronopus didymus*
575 foram considerados inibidores eficazes da glicólise que os micro-organismos usam para
576 obtenção de energia o que pode ter contribuído para a ação nesses micro-organismos. No
577 entanto, alguns estudos relataram que as cepas de *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia*
578 *coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio sp.* e *Staphylococcus aureus* apresentaram
579 resistência aos extratos de *Coronopus didymus* (Shakoor et al., 2018). A diferença na
580 sensibilidade das cepas bacterianas aos extratos de *Coronopus didymus* pode ser atribuída
581 a diversos fatores, incluindo as propriedades químicas do extrato, as características
582 biológicas das bactérias e as condições experimentais.

583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596

597 **5. Conclusão**

598 A condição ótima de extração foi obtida com 44,62% de álcool, 100 mL/g de solvente-
599 massa e 85 °C, em um tempo de 120 min, gerando um extrato com maiores atividades
600 antioxidantes e antimicrobianas. A temperatura e a concentração de álcool foram as
601 variáveis de processo que mais influenciaram o rendimento de recuperação do teor de
602 compostos fenólicos.

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629 **6. Referências**

630 Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Olalere, O. A. (2018). Ethanollic extraction of
631 bioactive compounds from *Vernonia amygdalina* leaf using response surface
632 methodology as an optimization tool. *Journal of Food Measurement and Characterization*,
633 12, 1107-1122. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9726-3>.

634 Amendola, D., De Faveri, D. M., & Spigno, G. (2010). Grape marc phenolics:
635 Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *Journal of Food Engineering*, 97(3),
636 384-392.

637 Awad, E., & Awaad, A. (2017). Role of medicinal plants on growth performance and
638 immune status in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 40–
639 54. doi:10.1016/j.fsi.2017.05.034.

640 Basilio-Cortes, U. A., Tzintzun-Camacho, O., Grimaldo-Juárez, O., Durán-
641 Hernández, D., Suarez-Vargas, A., Durán, C. C., & González-Mendoza, D. (2023).
642 Impact of temperature on the bioactive compound content of aqueous extracts of *Humulus*
643 *lupulus* L. with different alpha and beta acid content: A new potential antifungal
644 alternative. *Microbiology Research*, 14(1), 205-217.

645 Boeing, J. S., Barizão, É. O., e Silva, B. C., Montanher, P. F., de Cinque Almeida, V.,
646 & Visentainer, J. V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic
647 compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal
648 component analysis. *Chemistry central journal*, 8, 1-9.

649 Borges, A., José, H., Homem, V., & Simões, M. (2020). Comparison of Techniques
650 and Solvents on the Antimicrobial and Antioxidant Potential of Extracts from *Acacia*
651 *dealbata* and *Olea europaea*. *Antibiotics*, 9(2), 48. . doi:10.3390/antibiotics9020048.

652 Che Sulaiman, I. S., Basri, M., Fard Masoumi, H. R., Chee, W. J., Ashari, S. E., &
653 Ismail, M. (2017). Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of
654 phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves
655 by response surface methodology. *Chemistry Central Journal*,
656 11(1). doi:10.1186/s13065-017-0285-1.

657 Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Aida, W. W., & Ho, C. W. (2011).
658 Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the
659 recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus*
660 extracts. *International Food Research Journal*, 18(4), 1427.

661 CLSI (Ed.), 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing,
662 30th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. CLSI supplement
663 M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.

664 Gam, D. H., Kim, S. Y., & Kim, J. W. (2020). Optimization of Ultrasound-Assisted
665 Extraction Condition for Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, and
666 Epigallocatechin Gallate in Lipid-Extracted Microalgae. *Molecules*, 25(3),
667 454. doi:10.3390/molecules25030454.

668 Effendi, I., Yoswaty, D., Syawal, H., Austin, B., Lyndon, A. R., Kurniawan, R., &
669 Al-Harbi, A. (2022). The use of medicinal herbs in aquaculture industry: a
670 review. *Current Aspects in Pharmaceutical Research and Development*, 7, 7-20.

671 Gomes, R. M. M., Ramírez, J. R. B., Buitrago, A. M., Colombo, G. M., Pereira, A.
672 C., Roselet, F., ... & Monserrat, J. M. (2024). Biofloc residue conversion from shrimp
673 production: Optimizing polyphenol extraction for silver nanoparticles synthesis with
674 antibacterial and antibiofilm properties. *Aquaculture*, 585, 740719.

675 Gutiérrez-del-Río, I., López-Ibáñez, S., Magadán-Corpas, P., Fernández-Calleja, L.,
676 Pérez-Valero, Á., Tuñón-Granda, M., ... & Lombó, F. (2021). Terpenoids and
677 polyphenols as natural antioxidant agents in food preservation. *Antioxidants* 2021, 10,
678 1264. <https://doi.org/10.3390/antiox10081264>.

679 Insang, S., Kijpatanasilp, I., Jafari, S., Assatarakul, K., (2021). Ultrasonics
680 Sonochemistry Ultrasound-assisted extraction of functional compound from mulberry
681 (*Morus Alba* L.) leaf using response surface methodology and effect of
682 microencapsulation by spray drying on quality of optimized extract. *Ultrasonics*
683 *Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105806>.

684 Kinupp, V. F., & Barros, I. B. I. D. (2008). Teores de proteína e minerais de espécies
685 nativas, potenciais hortaliças e frutas. *Food Science and Technology*, 28, 846-857.

686 Kop, A., Gamsız, K., Korkut, A. Y., & Sayğı, H. (2019). The effects of different
687 storage temperatures and durations on peroxide values of fish feed ingredients. *Turkish*
688 *Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7, 43-49.

689 Lefebvre, T., Destandau, E., & Lesellier, E. (2021). Selective extraction of bioactive
690 compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of*
691 *Chromatography A*, 1635, 461770. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461770>.

692 Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Cabrera-Bañegil, M., Martín-Vertedor, D., &
693 Delgado-Adámez, J. (2017). Application of Phenolic Compounds for Food Preservation:
694 Food Additive and Active Packaging. *Phenolic Compounds - Biological*
695 *Activity*. doi:10.5772/66885.

696 Mokrani, A., & Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the
697 extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.)
698 fruit. *Separation and Purification Technology*, 162, 68-76.

699 Muzammil, S.; Wang, Y.; Siddique, M.H.; Zubair, E.; Hayat, S.; Zubair, M.; Roy, A.;
700 Mumtaz, R.; Azeem, M.; Emran, T.B.; (2022). Polyphenolic Composition, Antioxidant,
701 Antiproliferative and Antidiabetic Activities of *Coronopus didymus* Leaf Extracts.
702 *Molecules*, 27, 6263. <https://doi.org/10.3390>.

703 Nguyen, T. L., Ora, A., Häkkinen, S. T., Ritala, A., Räisänen, R., Kallioinen-Mänttari,
704 M., & Melin, K. (2023). Innovative extraction technologies of bioactive compounds from
705 plant by-products for textile colorants and antimicrobial agents. *Biomass Conversion and*
706 *Biorefinery*, 1-30.

707 Noreen, H., Semmar, N., Farman, M., & McCullagh, J. S. O. (2017). Measurement of
708 total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant
709 *Coronopus didymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), 792–
710 801. doi:10.1016/j.apjtm.2017.07.024.

711 Pham, H. N. T., Vuong, Q. V., Bowyer, M. C., & Scarlett, C. J. (2017). Optimization
712 of ultrasound-assisted extraction of *Helicteres hirsuta* Lour. for enhanced total phenolic
713 compound and antioxidant yield. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic*
714 *Plants*, 7, 113–123. doi:10.1016/j.jarmap.2017.07.002.

715 Pitino, R., De Marchi, M., Manuelian, C. L., Johnson, M., Simoni, M., Righi, F., &
716 Tsiplakou, E. (2021). Plant Feed Additives as Natural Alternatives to the Use of Synthetic
717 Antioxidant Vitamins on Yield, Quality, and Oxidative Status of Poultry Products: A
718 Review of the Literature of the Last 20 Years. *Antioxidants*, 10(5),
719 757. doi:10.3390/antiox10050757.

720 Ramos, D. F., Bartolomeu Halicki, P. C., da Silva Canielles Caprara, C., Borges, P.,
721 da D'Oca, M. G. M., de Fátima, C., Santos, M., ... & Abreu, P. C., 2022. Chemical profile
722 and antimicrobial activity of the marine diatom *Chaetoceros muelleri*. *Chem. Biodivers.*,
723 19(5), e202100846. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100846>.

724 Rathee, P., Sehrawat, R., Rathee, P., Khatkar, A., Akkol, E. K., Khatkar, S., &
725 Sobarzo-Sánchez, E. (2023). Polyphenols: natural preservatives with promising
726 applications in food, cosmetics and pharma industries; problems and toxicity associated
727 with synthetic preservatives; impact of misleading advertisements; recent trends in
728 preservation and legislation. *Materials*, 16(13), 4793. [https://doi.org/10.3390/](https://doi.org/10.3390/ma16134793)
729 [ma16134793](https://doi.org/10.3390/ma16134793).

730 Rodríguez-Pérez, C., Gilbert-López, B., Mendiola, J. A., Quirantes-Piné, R., Segura-
731 Carretero, A., & Ibáñez, E. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction and
732 pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* leaves by
733 multiresponse surface methodology. *electrophoresis*, 37(13), 1938–
734 1946. doi:10.1002/elps.201600071.

735 Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-
736 Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2006). Metodologia científica: determinação da
737 atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)(Embrapa
738 Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico, No. 125, 4 p.). Fortaleza: Embrapa
739 Agroindústria Tropical.

740 Salami, S. A., Guinguina, A., Agboola, J. O., Omede, A. A., Agbonlahor, E. M., &
741 Tayyab, U. (2016). Review: In vivo and postmortem effects of feed antioxidants in
742 livestock: a review of the implications on authorization of antioxidant feed additives.
743 *Animal*, 10(08), 1375–1390. doi:10.1017/s1751731115002967.

744 Santos, L. G., & Martins, V. G. (2023). Optimization of the green extraction of
745 polyphenols from the edible flower *Clitoria ternatea* by high-power ultrasound: A
746 comparative study with conventional extraction techniques. *Journal of Applied Research*
747 *on Medicinal and Aromatic Plants*, 34, 100458.

748 Sartori, V.C ; Theodoro, H ; Minello , L.V; Pansera, M. R ; Basso, A; Scur, L .2020.
749 Plantas Alimentícias Não Convencionais – PANC : resgatando a soberania alimentar e
750 nutricional / organizadores Editora da Universidade de Caxias do Sul 2. ed.

751 Shakoor, A., & Zaib, G. (2018). Biological activities of three medicinal plants from
752 district Mirpur, AJK, Pakistan. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(6).

753 Shefat, S. H. T., & Karim, M. A. (2018). Nutritional diseases of fish in aquaculture
754 and their management: A review. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 2(12), 50-58.

755 Shi, F., Jiang, Z. B., Xu, J., Bai, X. P., Liang, Q. Y., & Fu, Z. H. (2022). Optimized
756 extraction of phenolic antioxidants from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) seeds by
757 subcritical water extraction using response surface methodology. *Journal of Food*
758 *Measurement and Characterization*, 16(3), 2240-2258. [https://doi.org/10.1007/s11694-](https://doi.org/10.1007/s11694-021-01212-1)
759 021-01212-1.

760 Stagos, D. (2019). Antioxidant Activity of Polyphenolic Plant Extracts. *Antioxidants*,
761 9(1), 19. doi:10.3390/antiox9010019.

762 Syanya, F. J., Litabas, J. A., Mathia, W. M., & Ntakirutimana, R. (2023). Nutritional
763 fish diseases in aquaculture: A human health hazard or mythical theory: An
764 overview. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, 15(8), 41-58.
765 <https://doi.org/10.9734/ejnfs/2023/v15i81326>.

766 Usman, I., Hussain, M., Imran, A., Afzaal, M., Saeed, F., Javed, M., & A. Saewan,
767 S. (2022). Traditional and innovative approaches for the extraction of bioactive
768 compounds. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 1215-1233.

769 Waterhouse, A. L . (2002). Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in*
770 *Food Analytical Chemistry* 6(1):1-8 doi : 10.1002/0471142913.fai0101s06.

771 Yan, X., Li, Z., Dong, X., Tan, B., Pan, S., Li, T., ... & Yang, Y. (2022). Degradation
772 of muscle quality in hybrid grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus*
773 *lanceolatu*) due to oxidative damage caused by ingestion of oxidized fish oil. *Frontiers in*
774 *Nutrition*, 9, 840535.

775

776

777

CAPÍTULO II

778

779

780 **AVALIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DAS FOLHAS DE MESTRUZ (*Coronapus***
781 ***didymus*) EM RAÇÕES PARA PEIXES**

782 Alex Zefanias Baloi ^{1,2,3}, , Marcelo Borges Tesser ^{1,3}, José Maria Monserrat ^{1,4}, Juan
783 Rafael Buitrago Ramírez ^{1,4}, Robson Matheus Marreiro Gomes ^{1,4}, Vilásia Guimarães
784 Martins ^{1,2}

785 1 Programa de Pós-Graduação em Aquicultura (PPGAqui), Instituto de Oceanografia
786 (IO), Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil

787 2 Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Escola de Química e Alimentos (EQA),
788 Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil

789 3 Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA), Instituto de
790 Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil

791 4 Laboratório de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos (BIFOA), Instituto de
792 Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil

793

794 Artigo em preparação para submissão a revista Aquaculture International

795

796

RESUMO

797 Este trabalho teve como objetivo verificar a eficácia do extrato da folha de mestruz
798 (*Coronapus didymus*) incorporado na ração para peixes ao longo de 6 semanas de
799 armazenamento, avaliando a peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante. Para a
800 obtenção dos extratos foram utilizados 44,62% de etanol (v/v), em uma relação sólido-
801 solvente de 1 g para 100 mL, a 85°C por 120 min. Posteriormente, foram formuladas
802 cinco dietas isoproteicas (37% de proteína bruta) e isolipídicas (9% de lipídios), com
803 diferentes níveis de inclusão de extratos antioxidantes, dieta com inclusão de extrato na
804 concentração equivalente à atividade antioxidante do BHT (100 mg/kg) sendo estas: Dieta
805 controle (sem adição do extrato); Dieta com BHT na concentração de 100 mg/kg, Dieta
806 com inclusão de extrato na concentração equivalente à atividade antioxidante do BHT
807 (100 mg/kg), calculado na base de atividade antioxidante DPPH; Dieta com inclusão de
808 extrato em nível reduzido (50 mg/kg); e dieta com inclusão de extrato em nível elevado
809 (200 mg/kg). As dietas foram dispostas em bandejas e armazenadas em estufa com

810 circulação e renovação de ar. A temperatura foi monitorada diariamente, enquanto a
811 atividade antioxidante e a peroxidação lipídica foram analisadas nas semanas 0, 2, 4 e 6
812 de armazenamento. Os resultados demonstram a eficácia do extrato das folhas de mestruz,
813 pois a inclusão de extratos em níveis de 50 mg/kg e 100 mg/kg eq. de BHT e a
814 concentração de 100 mg/kg de BHT foram mais eficazes na inibição da peroxidação
815 lipídica do que a concentração mais alta de 200 mg/kg.

816

817 **Palavras- Chave:** Aquicultura, oxidação lipídica, atividades antioxidantes, plantas não
818 convencionais

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841 **1. Introdução**

842 A aquicultura é vista como um sistema vital para a produção de alimentos em
843 escala global, recebendo significativa atenção por sua importância na promoção da
844 nutrição e da segurança alimentar (Mbewe et al., 2024). Esta tem se tornado uma atividade
845 sustentável e competitiva na produção de alimentos de alta qualidade e valor nutricional
846 elevado em diversas partes do mundo (Oliveira, 2021; Van Doan et al., 2022). Este setor
847 tem se expandido significativamente para atender à crescente demanda por proteínas de
848 origem aquática, especialmente em regiões com limitações em fontes terrestres de
849 proteína (Ahmad et al., 2021). No entanto, apesar de seu crescimento, a aquicultura
850 enfrenta diversos desafios, particularmente em relação às doenças (Zhu, 2020). A
851 prevenção de doenças é prioritária em relação ao tratamento, especialmente no caso de
852 enfermidades relacionadas à alimentação. O armazenamento das rações pode resultar em
853 oxidação lipídica, levando à produção de compostos tóxicos que afetam a saúde dos
854 peixes; além disso, a degradação de nutrientes essenciais compromete o valor nutricional,
855 prejudicando o crescimento e a imunidade, favorecendo também o crescimento de
856 micotoxinas e bactérias patogênicas, aumentando o risco de doenças (Shefat & Karim,
857 2018)

858 O consumo de alimentos estragados, mal acondicionados ou com deficiências
859 nutricionais pode ser fonte significativa de doenças. Para amenizar esse problema,
860 antioxidantes são incorporados a produtos alimentares com o objetivo de evitar a
861 peroxidação lipídica e o desenvolvimento de ranço oxidativo ao longo das etapas de
862 produção, processamento e armazenamento dos alimentos (Salami et al., 2016).

863 Uma das abordagens comuns para reduzir perdas na aquicultura é a utilização de
864 antioxidantes sintéticos, como o Butil Hidroxitolueno (BHT) e o Butil Hidroxi Anisol
865 (BHA). Esses aditivos são eficazes em retardar a oxidação lipídica nos alimentos
866 utilizados na nutrição dos peixes, ajudando a manter a qualidade nutricional da ração e
867 promovendo o bem-estar dos animais (Lee et al., 2023; Taşbozan & Erbaş, 2023).

868 Neste contexto, dietas desequilibradas, oxidadas e deterioradas devido ao
869 armazenamento inadequado, juntamente com condições estressantes, tornam os peixes
870 mais suscetíveis a doenças, resultando em perdas econômicas devido à mortalidade dos
871 animais (Taşbozan & Erbaş, 2023). Alguns aditivos alimentares podem ser utilizados para
872 melhorar e aumentar o valor nutricional das rações, minimizar os impactos adversos de

873 fatores antinutricionais e estimular o consumo de alimentos pelos peixes (Filipe et al.,
874 2023).

875 Em resposta a essas preocupações, cresce o interesse pela substituição dos
876 antioxidantes sintéticos por alternativas naturais como extratos vegetais, ricos em
877 compostos bioativos, como os polifenóis que têm mostrado potencial antioxidante
878 significativo, sendo eficazes na prevenção da oxidação lipídica (Uzombah, 2022). Esses
879 extratos ricos em polifenóis, são provenientes de cascas, flores, folhas, bagaço de frutas
880 e das plantas não convencionais (Santos e Martins, 2023). O uso de antioxidantes naturais,
881 além de ser uma abordagem mais sustentável, pode oferecer benefícios adicionais à saúde
882 dos animais, com menor risco de efeitos colaterais indesejados. Desta forma, a utilização
883 de extratos naturais surge como uma alternativa promissora para a indústria aquícola,
884 alinhando-se às tendências de consumo consciente e produção sustentável.

885 A Mestruz (*Coronopus didymus*) é uma planta que cresce espontaneamente em hortas,
886 pastagens e áreas de cultivo no inverno. Embora seja considerada invasora, tem sabor
887 similar ao agrião e é nativa da América do Sul, predominando nas regiões Sul e Sudeste
888 do Brasil. Os seus extratos possuem propriedades antifúngicas, antioxidantes,
889 antimaláricas, antitumorais, cicatrizantes e anti-inflamatórias em humanos (Muzammil et
890 al., 2022; Busnardo et al., 2010). No entanto, pouco se sabe sobre a possibilidade de uso
891 desta planta ou de seu extrato em dietas para organismos aquáticos.

892 O objetivo deste trabalho foi estudar a eficácia do extrato da folha de mestruz
893 (*Coronopus didymus*) incorporado na ração para peixes ao longo de 6 semanas de
894 armazenamento, avaliando-se a peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante.

895

896 **2. Material e Métodos**

897 **2.1. Reagentes**

898 Os reagentes Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), DPPH
899 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TPTZ (2,4,6- Tri (2-Piridil)-s-Triazina), ABTS (2,2'-
900 Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), foram adquiridos da Sigma – Aldrich
901 Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico

902

903 **2.2. Folhas de mestruz**

904 As folhas de mestruz (*Coronopus didymus*) foram coletadas ao redor da horta do
905 Cassino, Unidade de censitária 34, Rio Grande/RS – Brasil. As folhas foram higienizadas
906 com água e com solução de hipoclorito a 200 ppm por 10 min, desidratadas em estufas
907 com circulação e renovação de ar por 24 h a uma temperatura de 45°C. Após, foram
908 trituradas em moinho de facas (Marconi modelo MA 090) até 60 mesh. A farinha de
909 folhas obtida foi acondicionada em sacos plásticos transparentes de polietileno e
910 armazenadas a -18°C.

911

912 **2.3. Procedimento de extração**

913 A extração dos compostos bioativos foi realizada em Erlenmeyers de 250 mL,
914 utilizando-se um agitador magnético (IKA RT 15) a 500 rpm . Utilizou-se etanol a 44,62%
915 (v/v), com uma relação sólido-solvente de 1 g para 100 mL, à temperatura de 85°C,
916 durante 120 min. Após o processo de extração, as amostras foram centrifugadas a 15000
917 × g por 10 min a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -45°C até sua
918 utilização.

919

920 **2.4. Cálculo da equivalência de atividade antioxidante**

921 Para calcular a equivalência antioxidante entre o butil-hidroxitolueno (BHT) e o
922 extrato das folhas de Mestruz (*Coronopus didymus*), foi utilizado o teste de eliminação
923 do radical DPPH. De acordo com a regulamentação da Anvisa (2022), o uso de BHT é
924 permitido até o limite de 150 mg/kg como aditivo alimentar. No entanto, neste estudo,
925 optou-se por utilizar 100 mg/kg de BHT, considerado um valor seguro e dentro do limite
926 regulamentado. Foi preparada uma solução de BHT em etanol na concentração de 100
927 mg/L, equivalente a 100 mg/kg. A atividade antioxidante obtida com a solução de BHT
928 (100 mg/L) foi de 7.419,85 µM Eq.Trolox/mL, enquanto a do extrato das folhas de
929 *Mestruz* foi de 28.789,61 µM Eq.Trolox/mL. Foram utilizados diferentes volumes do
930 extrato durante a formulação da ração para atingir as concentrações equivalentes ao BHT
931 de 50 mg/kg (3.709,93 µM Eq.Trolox/mL), 100 mg/kg (7.419,85 µM Eq.Trolox/mL) e
932 200 mg/kg (14.839,7 µM Eq.Trolox/mL).

933

934 **2.5. Formulação das dietas com os antioxidantes**

935 Foram formuladas cinco dietas isoproteicas (37% de proteína bruta) e isolipídicas
 936 (9% de lipídios), uma ração típica para peixes onívoros com diferentes níveis de inclusão
 937 de extratos antioxidantes, sendo estas: Dieta controle (sem adição do extrato); Dieta com
 938 BHT na concentração de 100 mg/kg, Dieta com inclusão de extrato na concentração
 939 equivalente à atividade antioxidante do BHT (100 mg/kg), calculado na base de atividade
 940 antioxidante DPPH; Dieta com inclusão de extrato em nível reduzido (50 mg/kg); e dieta
 941 com inclusão de extrato em nível elevado (200 mg/kg). A Tabela 1 apresenta todos os
 942 ingredientes utilizados nas formulações das dietas. Os ingredientes das dietas foram
 943 inicialmente misturados e homogeneizados manualmente. Em seguida foram umedecidas
 944 com água destilada e extrato na proporção de 1:2 (500 mL de água para cada 1000 g de
 945 ração) e processadas em um moedor de carne para formar os *pellets*. Posteriormente, os
 946 *pellets* foram secos em estufa com circulação de ar a 45°C por 24 h.
 947

948 **Tabela 1:** Ingredientes e composição centesimal das dietas experimentais (%)
 949 suplementadas com o extrato de folhas de Mestruz
 950

Ingredientes	Níveis de inclusão do extrato de mestruz (mg/Kg Eq.BHT)				
	Controle	50 mg/Kg Eq. BHT	100 mg/Kg Eq. BHT	200 mg/Kg Eq. Dobro do BHT	100 mg/Kg do BHT
Farinha de pescado (g)	33	33	33	33	33
Farelo de soja (g)	26	26	26	26	26
Amido de milho (g)	20	20	20	20	20
farelo de trigo (g)	15	15	15	15	15
Celulose (g)	2	2	2	2	2
Óleo de pescado (g)	2	2	2	2	2
Pré-mistura mineral e vitamínica (g) a	2	2	2	2	2
Total	100	100	100	100	100
Extrato das folhas suplementado às rações (mg/Kg Eq.BHT)		50	100	200	
BHT suplementado à ração(mg/kg)					100
Composição proximal					
Umidade	4.53 ±0.04	4.60±0.03	4.70±0.11	4.57±0.02	4.50±0.00

	Cinzas	11.51±0.18	11.39±0.14	11.50±0.09	11.48±0.21	11.39±0.04
	Proteína bruta	36.69±0.42	36.99±0.27	36.97±0.63	36.99±0.68	37.28±0.24
	Fibra bruta	1.20±2.00	1.47±1.76	2.25±1.85	2.52±1.30	3.98±3.35
	Conteúdo lipídico total	8.82±0.19	9.26±0.43	9.21±0.13	8.80±0.19	9.06±0.68
	Extrativo não sem nitrogenado	41.78	40.89	40.07	40.21	38.29

951 ^a Tectron Paraná Brasil Vitamina A (mín.) 2.000.000UI/kg, Vitamina D3 (mín.) 640.000UI/kg, vitamina
952 E (mín.) 2.400UI/kg, vitamina K3 (mín.) 680mg/kg, vitamina B1 (mín.)400mg/kg, vitamina B2 (mín.)
953 1.000 mg/kg, vitamina B6 (mín.) 1.200mg/kg, vitamina B12 (mín.) 4.000 mcg/kg, niacina (mín.)
954 9000mg/kg, ácido pantotênico (mín.) 3000mg/kg, ácido fólico (mín.) 400mg/kg, biotina (min.) 35mg/kg,
955 manganês (mín.)14g/kg, zinco (mín.) 11g/kg, ferro (mín.) 10g/kg, cobre (mín.) 2.000mg/kg, iodo (mín)
956 200 mg/kg, cobalto (mín.) 40mg/kg, selênio (mín.) 40mg/kg.
957

958 **2.5.1. Condições de armazenamento**

959 Os peletes secos (100 g) foram dispostos em bandejas e armazenados em estufa com
960 circulação e renovação de ar a uma temperatura de aproximadamente 25°C. Diariamente,
961 foram registrados os dados de temperatura e umidade das três prateleiras da estufa, cada
962 uma contendo uma repetição das formulações experimentais, utilizando três termo-
963 higrômetros digitais da marca Incoterm. A atividade antioxidante e a peroxidação lipídica
964 foram avaliadas nas semanas 0, 2, 4 e 6 de armazenamento, de acordo com a metodologia
965 descrita por Filipe et al. (2023).

966 **2.5.2. Composição Proximal da ração**

967 O teor de umidade foi calculado a partir do peso das amostras antes e após a secagem
968 em estufa de secagem (Q317M-52, Quimis, Diadema, Brasil) a 105 °C por 12 h (AOAC,
969 2007). O teor de cinzas foi determinado gravimetricamente após queima em forno mufla
970 (MA 385, Marconi, Piracicaba, Brasil) a 600 °C por 5 h (AOAC, 2007). O nitrogênio total
971 foi determinado pelo método micro-Kjeldahl (MA-036, Marconi, Piracicaba, Brasil) e o
972 teor de proteína bruta foi calculado como $N \times 6,25$ (AOAC, 2007). O conteúdo lipídico
973 total foi medido usando o método de extração a frio (Bligh e Dyer, 1959). Fibra bruta
974 determinado após a queima em forno mufla (MA 385, Marconi, Piracicaba, Brasil) a 550
975 °C por 1 h (AOAC, 2007).

976 **2.6. Peroxidação lipídica**

977 A determinação da peroxidação lipídica foi realizada pelo método de compostos
978 reativos com ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com o método descrito por Rakita

979 et al (2020), com algumas modificações. Amostras trituradas de ração (0,1 g) foram
980 misturadas com 0,5 mL de uma solução de BHT a 400 mg/L em tubos de Eppendorf de 2
981 mL, para prevenir a auto-oxidação da amostra. Em seguida, 0,75 mL de TCA a 5% foram
982 adicionados aos tubos, que foram misturados em vortex por 15 min e logo após
983 centrifugados a $14500 \times g$ por 10 min a 4°C , por 15 min. Após a centrifugação, 0,75 mL
984 do sobrenadante foi misturado com 1,5 mL de TBA a 0,6% e aquecido a 95°C por 60
985 min. Após o resfriamento, a absorvância foi lida a 532 nm. Os resultados foram calculados
986 com base na curva padrão e expressos como nmol de malondialdeído (MDA) por grama
987 da dieta (nmol/g).

988

989 **2.7. Análise de compostos ativos dos extratos da ração**

990 Para análise de compostos fenólicos e atividades antioxidantes foi necessário fazer
991 uma extração destes compostos a partir das rações formuladas, seguindo o método
992 descrito por Colombo et al. (2023), com algumas modificações. A extração dos
993 compostos ativos da ração foi realizada utilizando álcool 40% como solvente, na
994 proporção de 1:10 (massa/volume). O processo de extração foi conduzido por meio de
995 ultrassom (Qsonica) com amplitude ajustada a 70%. Esse procedimento foi realizado por
996 1 min e 30 s. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a $12500 \times g$ por 15 min,
997 a 4°C , e o sobrenadante foi utilizado para análise de conteúdo total de polifenóis (TPC),
998 DPPH e ABTS.

999 **2.7.1. Determinação do conteúdo total de polifenóis**

1000 O conteúdo total de polifenóis foi determinado usando o método de Folin-Ciocalteu,
1001 conforme descrito por Waterhouse (2002), com algumas modificações. Para este fim, 15
1002 μL do extrato foi transferido para um tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 1,26 mL
1003 de reagente de Folin-Ciocalteu (10% v/v) e incubados por 8 min no escuro em temperatura
1004 ambiente (25°C). Subsequentemente, foram adicionados 225 μL de solução de carbonato
1005 de sódio (25%). Após uma nova incubação em temperatura ambiente (25°C) no escuro
1006 por 2 h, a absorvância da mistura foi medida usando um espectrofotômetro UV-VIS
1007 (Kasuaki IL592, Brasil) a 765 nm. Um padrão de ácido gálico foi usado para a curva de
1008 calibração, e os valores foram expressos em microgramas de equivalentes de ácido gálico
1009 por grama de amostra ($\mu\text{g AG/g}$ de amostra).

1010 **2.7.2. Atividade Sequestradora de radicais DPPH**

1011 A atividade sequestradora de radicais livres DPPH foi avaliada de acordo com o
1012 método descrito por Noreen et al. (2017), com algumas modificações, onde o radical
1013 DPPH foi preparado com metanol absoluto na concentração de 80 μM . Para a análise,
1014 1,8 mL dos radicais foram misturados separadamente com 10 μL do extrato e mantidos a
1015 temperatura ambiente 25 °C por 30 min, a leitura foi realizada em 515 nm. Um padrão
1016 Trolox foi utilizado para a curva de calibração e a capacidade de eliminação contra o
1017 radical DPPH foi expressa em μM equivalente de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{M TE/g}$
1018 de amostra).

1019

1020 **2.7.3. Eliminação de radicais ABTS**

1021 A capacidade de eliminação de radicais livres ABTS foi avaliada pelo método descrito
1022 por Santos e Martins (2023) com algumas modificações. O radical ABTS foi preparado
1023 após a mistura das soluções de ABTS (7 mM) e persulfato (140 mM) por 16 h. A mistura
1024 foi então diluída em etanol absoluto até que a absorbância estivesse entre 0,65 e 0,75 nm,
1025 no comprimento de onda de 734 nm. 3 mL da solução de ABTS foram misturados com
1026 30 μL de extrato ou das soluções padrão Trolox para a curva de calibração. Após 6 min
1027 da mistura, a absorbância foi lida a 734 nm. A capacidade antioxidante contra o radical
1028 ABTS foi expressa em μM equivalente de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{M TE/g}$ de
1029 amostra).

1030

1031 **2.8. Análise Estatística**

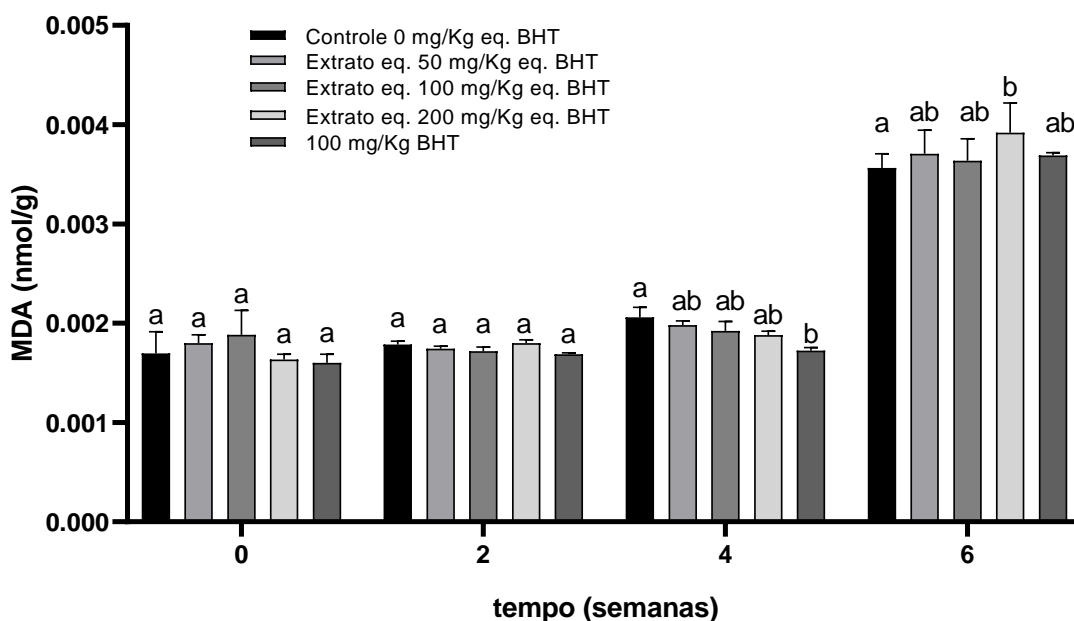
1032 Após a verificação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias
1033 pelo teste de Shapiro-Wilk e Bartlett, aplicou-se sobre os dados uma ANOVA de medidas
1034 repetidas no tempo para as semanas 1, 2, 4 e 6. As diferenças entre os tratamentos foram
1035 determinadas pelo teste de pos-hoc de Tukey. Todos os testes estatísticos foram aplicados
1036 utilizando o valor de significância de ($p < 0,05$).

1037 **3. Resultados**

1038 **3.1. Peroxidação lipídica**

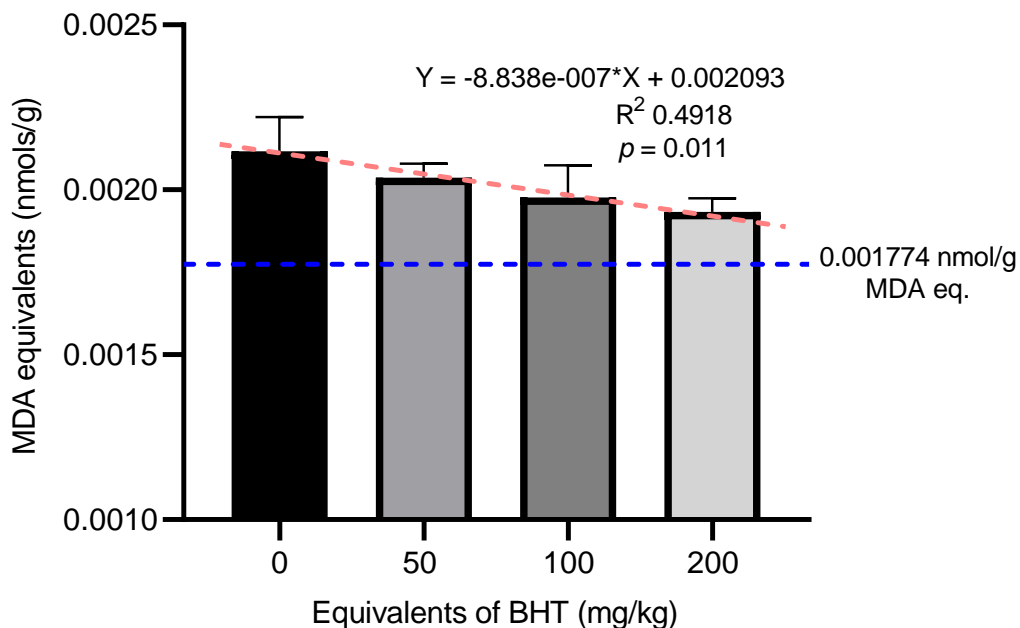
1039 No presente estudo, as dietas experimentais são compostas por 2% de óleo de pescado
1040 e 33% de farinha de pescado (Tabela 1), sendo ambos os ingredientes especialmente

1041 suscetíveis à oxidação devido ao alto teor de ácidos graxos insaturados. Na semana zero,
 1042 todos os grupos, incluindo o controle (sem extrato) e as diferentes concentrações de
 1043 extrato e BHT, apresentaram valores baixos e semelhantes de malondialdeído (MDA)
 1044 (Figura 1). No entanto, após a 2ª semana de armazenamento, observou-se um aumento
 1045 leve na concentração de MDA em todos os grupos, sem diferenças estatisticamente
 1046 significativas entre eles. Após a 4ª semana de armazenamento, o controle apresentou uma
 1047 diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com 100 mg/Kg de
 1048 BHT, enquanto os demais grupos não mostraram diferenças significativas em comparação
 1049 com o controle. Na 6ª semana de armazenamento, houve diferença entre o controle e a
 1050 concentração de extrato eq. 200 mg/kg eq. BHT; no entanto, essa concentração apresentou
 1051 os maiores valores de MDA, superiores às concentrações mais baixas de extrato e ao
 1052 tratamento com 100 mg/kg de BHT.



1053

1054 **Figura 1:** Concentração de malondialdeído (MDA) ao longo do tempo de
 1055 armazenamento. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos dentro de cada
 1056 semana ($p < 0,05$).



1057

1058

1059 **Figura 2:** Níveis de peroxidação lipídica (expressos como equivalentes de MDA) em
 1060 função da concentração de extratos equivalente a mg/kg de BHT e 100mg/kg BHT na
 1061 ração de peixe durante a 4ª semana de armazenamento. Linha pontuada azul representa a
 1062 média obtida pelo tratamento com 100 mg/Kg de BHT. Linha pontuada vermelha indica
 1063 a tendência/ regressão linear, que mostra como os valores de MDA mudam à medida que
 1064 a concentração de equivalentes de BHT (mg/kg) aumenta

1065

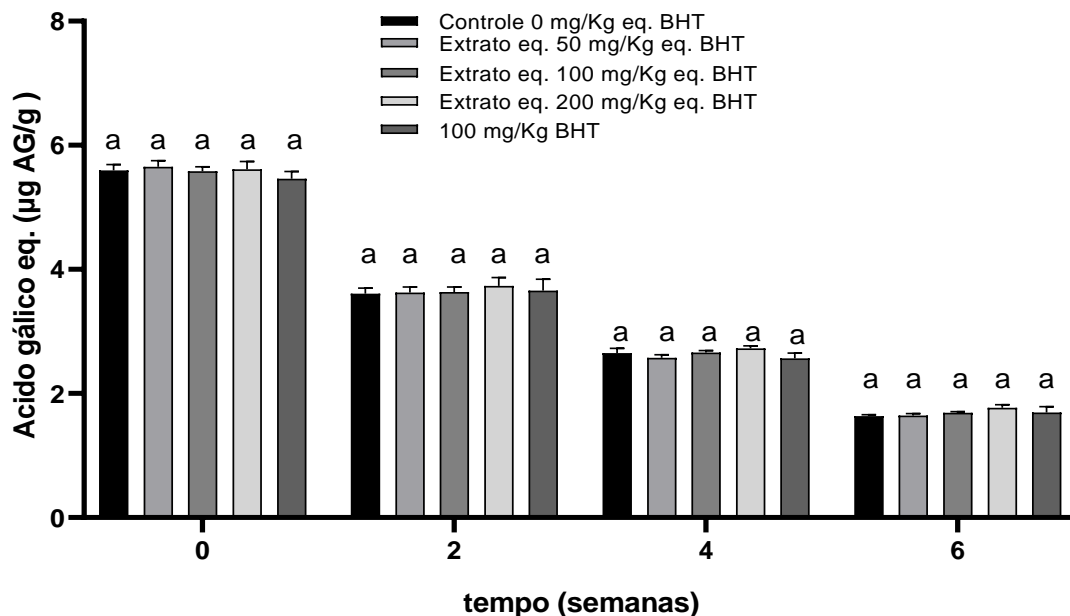
1066 3.2.Compostos fenólicos e atividades antioxidantes

1067 3.2.1. Conteúdo total de polifenóis

1068 Ao longo do armazenamento, os níveis de polifenóis equivalente ao ácido gálico
 1069 diminuíram de forma semelhante entre todos os grupos analisados. Inicialmente, tanto o
 1070 grupo controle quanto os diferentes tratamentos, que incluíam concentrações de extrato
 1071 eq. 50, 100 e 200 mg/kg equivalentes a BHT, bem como o tratamento com 100 mg/kg de
 1072 BHT, apresentaram valores semelhantes, cerca de 6 µg eq.AG/g na 1ª semana (Figura 3).

1073 No entanto, na 2ª semana, foi observado uma diminuição significativa nos níveis de
 1074 polifenóis eq. De ácido gálico em todos os grupos, quando comparados aos valores da 1ª
 1075 semana. Essa tendência de redução continuou nas semanas subsequentes, com os níveis
 1076 de polifenóis apresentando uma nova diminuição na 4ª e 6ª semana estabilizando-se em

1077 aproximadamente 2 μg eq.AG/g. Esses dados são ilustrados na Figura 3, que mostra a
1078 tendência contínua de declínio ao longo do tempo.



1079

1080

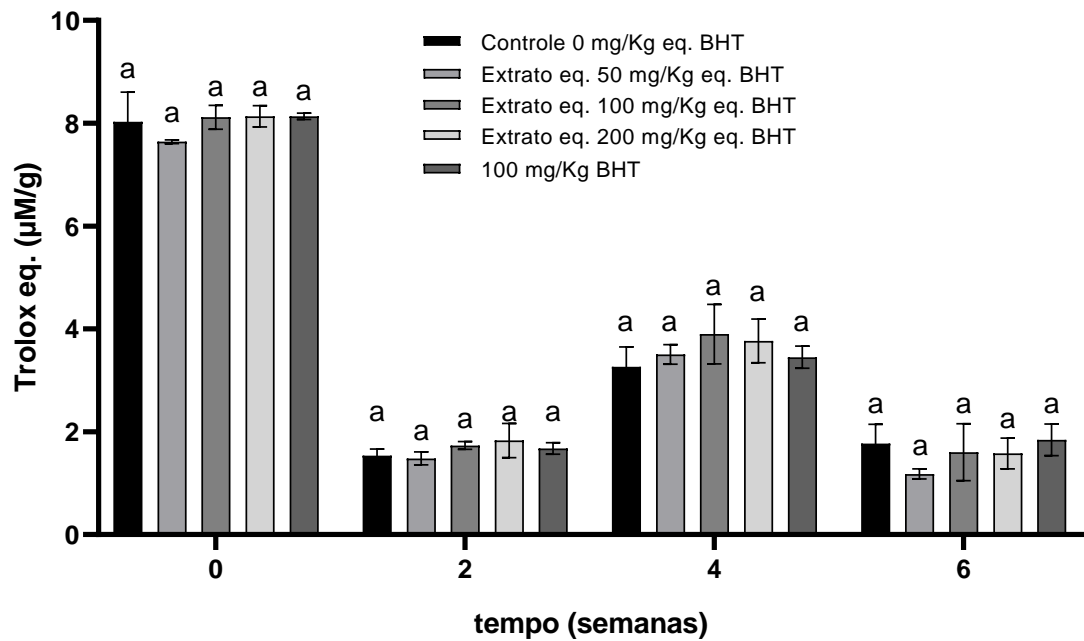
1081 **Figura 3:** Determinação dos polifenóis ao longo do tempo de armazenamento. Letras
1082 iguais indicam que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$).

1083

1084 3.2.2. Atividade Sequestradora de radicais DPPH

1085 A atividade antioxidante da ração durante o tempo de experimento está apresentada
1086 na Figura 4. Tanto o controle (0 mg/kg eq. BHT) e os tratamentos com extratos e BHT
1087 mostraram um padrão uniforme na 1ª semana com aproximadamente 8 μM equivalente
1088 de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{M TE/g}$) em todos os grupos. Depois da 2ª semana foi
1089 observado uma diminuição significativa nos níveis em todos os grupos, sem qualquer
1090 diferença significativa entre eles, quando comparados aos valores da 1ª semana entre o
1091 controle (0 mg/kg eq. BHT) e os tratamentos com extratos e BHT. Na 2ª semana, as
1092 análises continuaram a mostrar que as diferenças entre o controle e os tratamentos não
1093 foram estatisticamente significativas. Esse padrão de ausência de diferenças significativas
1094 persistiu até a 6ª semana.

1095



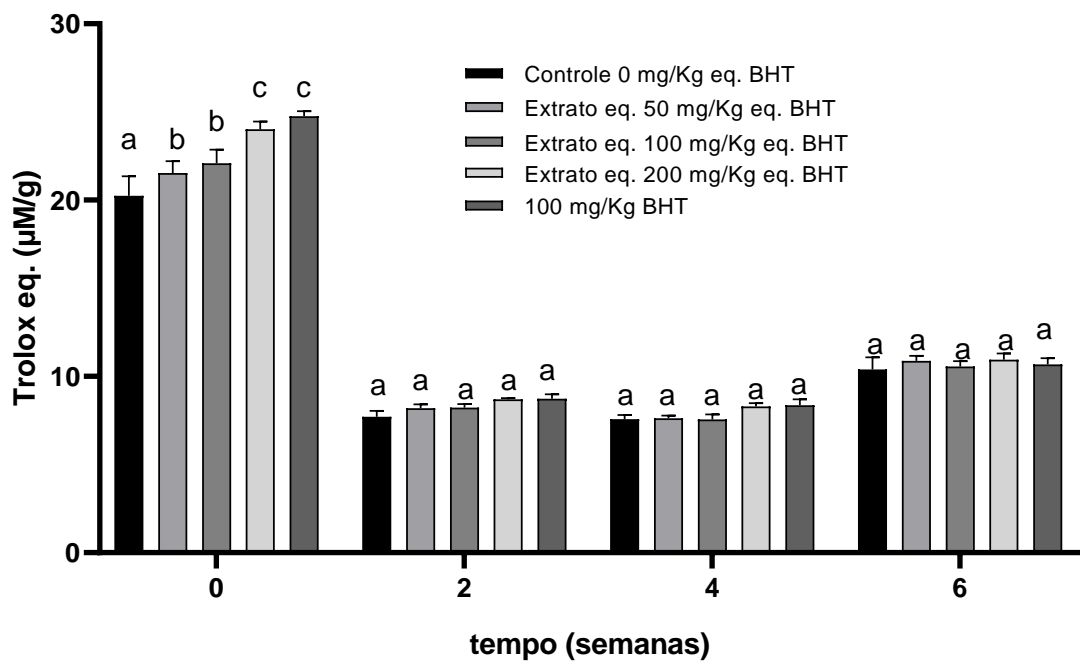
1096

1097 **Figura 4:** Atividade antioxidante (DPPH) ao longo do tempo de armazenamento. As
 1098 barras representam as médias de cada tratamento com o desvio padrão. Letras iguais indicam
 1099 que não houve diferenças entre os tratamentos dentro de cada semana ($p > 0,05$).

1100

1101 3.2.3. Eliminação de radicais ABTS

1102 A análise de atividade antioxidante de eliminação de radicais ABTS na 1ª semana,
 1103 mostrou que todos os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas em
 1104 comparação com o controle (Figura 5).



1105

1106 **Figura 5:** Atividade antioxidante (ABTS) ao longo do tempo de armazenamento. Letras
 1107 diferentes indicam diferenças entre os tratamentos dentro de cada semana ($p < 0,05$)

1108

1109 3.3. Temperatura e umidade

1110 A temperatura média registrada durante o período de estudo foi de $24,79^{\circ}\text{C}$, com um
 1111 desvio padrão de 0,06, indicando uma variação mínima nas medições de temperatura. A
 1112 umidade relativa do ar apresentou uma média de 36,88%, com um desvio padrão de 0,24,
 1113 o que demonstra uma leve flutuação nos níveis de umidade.

1114

1115

1116

1117

1118

1119

1120

1121

1122 4. Discussão

1123 Os resultados do estudo indicam que, apesar da elevada suscetibilidade do óleo e da
1124 farinha de pescado à oxidação, os níveis de MDA foram baixos na 1ª semana. Todos os
1125 níveis ficaram dentro do valor considerado aceitável que é menor do que 2,21 mg/kg,
1126 estando aptos para o consumo, mesmo na dieta sem o extrato (Fan et al., 2023). Embora
1127 os níveis de MDA tenham aumentado ao longo do tempo, permaneceram dentro dos
1128 limites aceitáveis até a 6ª semana. Estudos anteriores demonstraram que doses elevadas
1129 de malondialdeído (MDA) na dieta ($\geq 4,43$ mg/kg) resultaram em danos significativos à
1130 mucosa gástrica e intestinal, além de reduzirem a expressão de genes antioxidantes, como
1131 o fator nuclear eritróide 2 (Fan et al., 2023). Esses níveis elevados também
1132 comprometeram as atividades enzimáticas digestivas e antioxidantes, enquanto
1133 aumentaram a presença de endotoxinas e o MDA no intestino. Por outro lado, doses mais
1134 baixas de MDA ($\leq 2,21$ mg/kg) não causaram esses efeitos adversos, sendo consideradas
1135 seguras para o crescimento e a saúde das garoupas híbridas (Fan et al., 2023). Os valores
1136 aceitáveis de MDA para os produtos para alimentação humana deve ser menor que 0,036
1137 mg/kg (Hematyar et al., 2018). Isso pode sugerir que, no curto prazo, os lipídios presentes
1138 nos ingredientes ainda não foram expostos suficientemente a condições que promovam a
1139 oxidação, como a presença de oxigênio ou luz, o que retardaria a formação de radicais
1140 livres e de produtos de oxidação lipídica, indicando às rações como adequadas para a
1141 alimentação animal e com ingredientes adequadamente estocados (protegidos do ar e a
1142 luz). Além disso, a composição inicial das dietas, incluindo possíveis antioxidantes já
1143 presentes nos ingredientes, pode ter contribuído para essa estabilidade inicial (Sousa et
1144 al., 2021). Estudos demonstram que o BHT, é eficaz em retardar a oxidação lipídica em
1145 alimentos (Yehye et al., 2015). No presente estudo, a concentração de 100 mg/kg de BHT
1146 apresentou diferença significativa em relação ao controle e igual para o resto de
1147 tratamentos após a 4ª semana de armazenamento. Isso está de acordo com a literatura, que
1148 mostra que o BHT age como um sequestrador de radicais livres, reduzindo a formação de
1149 MDA (Koltover, 2018). Os dados obtidos nesta pesquisa revelam que na 4ª semana há
1150 uma correlação moderada ($R^2 = 0,4918$) entre concentração de extratos equivalente mg/kg
1151 de BHT e níveis de MDA. Outras pesquisas mostraram uma correlação significativa entre
1152 a adição de extratos de *Angelica sinensis* (EAs) e a redução da peroxidação lipídica em

1153 rações para peixes, indicando que os EAs atuam como antioxidantes eficazes (Li et al.,
1154 2018).

1155 O aumento de MDA observado na concentração de 200 mg/kg de extrato em relação
1156 controle pode estar relacionado ao efeito pró-oxidante que alguns compostos não
1157 necessariamente antioxidantes presentes no extrato apresentam em altas doses. Esse
1158 fenômeno foi observado em outros estudos com antioxidantes naturais como vitamina C,
1159 vitamina E, carotenoides e polifenóis como flavonoides onde doses mais altas podem
1160 promover a oxidação em vez de inibi-la (Rietjens et al., 2002; Salami et al., 2016).
1161 Polifenóis, são conhecidos por sua sensibilidade a fatores como luz, temperatura e
1162 oxigênio, que influenciam sua estabilidade e capacidade antioxidante. Estudos mostram
1163 que polifenóis sofrem degradação oxidativa gerando compostos pró-oxidantes ao longo
1164 do tempo, especialmente quando expostos a condições ambientais adversas, como calor
1165 ou luz UV (Yordi et al., 2012).

1166 Por outro lado, as etapas de processamento e armazenamento de alimentos podem
1167 causar alterações nas características químicas e estruturais dos polifenóis, contribuindo
1168 para sua instabilidade. Em baixas temperaturas (4°C), os polifenóis permanecem estáveis
1169 por um período prolongado devido à menor atividade da enzima fenol oxidase, o que
1170 desacelera os processos de oxidação e degradação estrutural desses compostos (Cao et
1171 al., 2021; Deng et al., 2018). Durante o processamento e armazenamento de alimentos, a
1172 temperatura afeta significativamente os polifenóis. Assim, um controle rigoroso da
1173 temperatura é crucial para preservar seus níveis e estabilidade (Deng et al., 2018).

1174 Em relação ao DPPH, os resultados indicam que a atividade antioxidante da ração
1175 diminuiu significativamente ao longo do experimento. No entanto, não foram observadas
1176 diferenças significativas entre as semanas de armazenamento dentro de cada tratamento.
1177 É possível que as quantidades de MDA presentes não tenham sido suficientes para causar
1178 efeitos adversos significativos na atividade antioxidante. Além disso, a redução das
1179 atividades antioxidantes pode ter sido influenciada pela temperatura. Pesquisas indicam
1180 que a temperatura de armazenamento impacta os polifenóis e a atividade antioxidante.
1181 Em xarope de cereja, a manutenção em baixas temperaturas (-20 °C e 4 °C) preservou as
1182 propriedades antioxidantes e fenólicas por até 60 dias, enquanto temperaturas mais
1183 elevadas (28 °C e 40 °C) resultaram em perdas significativas a partir de 30 dias de
1184 armazenamento (Ouaabou et al., 2024). Comportamento semelhante, foi observado no

1185 purê de kiwi (*Actinidia arguta*), armazenado entre 5 e 45 °C e analisado em intervalos de
1186 12 h até 72 h. A degradação foi mais intensa nas primeiras 12 h. A amostra mantida a 5
1187 °C apresentou a maior estabilidade, preservando melhor tanto os compostos fenólicos
1188 quanto a capacidade antioxidante (Kim et al., 2018).

1189 Em relação ao ABTS, no primeiro dia, os tratamentos com extratos e BHT
1190 demonstraram aumentos significativos na atividade antioxidante em relação ao controle
1191 ($p < 0,0001$). Isso demonstrou que tanto os extratos quanto o BHT foram eficazes na
1192 neutralização dos radicais ABTS inicialmente. Esse aumento na atividade antioxidante
1193 pode ser atribuído à ação imediata dos compostos fenólicos e outros antioxidantes
1194 presentes nos extratos e no BHT, que possuem alta capacidade de doação de elétrons,
1195 neutralizando rapidamente os radicais livres. A diminuição observada de
1196 aproximadamente 25 $\mu\text{M TE/g}$ para menos de 10 $\mu\text{M TE/g}$ após 14 dias em todos os
1197 grupos sugere que os antioxidantes, tanto do BHT quanto dos extratos, perdem atividade
1198 ao longo do tempo, o que corrobora com estudos anteriores que demonstram a
1199 instabilidade dos compostos antioxidantes durante o armazenamento (Kim et al., 2018).

1200

1201

1202

1203

1204

1205

1206

1207

1208

1209

1210

1211

1212

1213

1214

1215 **5. Conclusão**

1216 Os resultados deste estudo mostraram que os compostos bioativos adicionados à dieta
1217 para aquicultura apresentaram valores intermediários durante o armazenamento nos
1218 tratamentos controle, extratos nos níveis de inclusão de 50 mg/kg, 100 mg/kg eq. BHT e
1219 BHT na concentração de 100 mg/kg. Não houve diferenças significativas entre esses
1220 grupos. A inclusão mais alta do extrato (200 mg/kg eq. BHT) apresentou os maiores níveis
1221 de peroxidação lipídica, demonstrando menor eficácia antioxidante na inibição da
1222 formação de MDA. Os dados indicam que, embora os extratos e o BHT ofereçam um
1223 aumento inicial na atividade antioxidante, esse efeito diminui ao longo das 6 semanas de
1224 armazenamento das rações, nas condições utilizadas neste estudo.

1225

1226

1227

1228

1229

1230

1231

1232

1233

1234

1235

1236

1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

1244

1245 **6. Referências**

1246 Ahmad, A., Sheikh Abdullah, S. R., Hasan, H. A., Othman, A. R., & Ismail, N. ‘Izzati.
1247 (2021). Aquaculture industry: Supply and demand, best practices, effluent and its current
1248 issues and treatment technology. *Journal of Environmental Management*, 287,
1249 112271. doi:10.1016/j.jenvman.2021.112271.

1250 Anvisa, 2022. Disponível em
1251 [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6372355/RDC_740_2022.pdf/e6881bdd-](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6372355/RDC_740_2022.pdf/e6881bdd-e06f-4212-bd35-105ad5e06b10)
1252 [e06f-4212-bd35-105ad5e06b10](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6372355/RDC_740_2022.pdf/e6881bdd-e06f-4212-bd35-105ad5e06b10)> acesso em 07/10/2024.

1253 AOAC. (2007) *Official Methods of Analysis*, 18th ed.; Association of Official
1254 Analytical Chemists: Gaithersburg, MA, USA.

1255 Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A (1959). rapid method of total lipid extraction and
1256 purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.

1257 Busnardo, T. C. P. M., Padoani, C., Mora, T. C., Biavatti, M. W., Fröde, T. S., Bürger,
1258 C., Souza, M. M. de. (2010). Anti-inflammatory evaluation of *Coronopus didymus* in the
1259 pleurisy and paw oedema models in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 519–
1260 525. doi:10.1016/j.jep.2009.12.017.

1261 Cao, H., Saroglu, O., Karadag, A., Diaconeasa, Z., Zoccatelli, G., Conte-Junior, C.
1262 A., Xiao, J. (2021). Available technologies on improving the stability of polyphenols in
1263 food processing. *Food Frontiers*, 2(2), 109–139. doi:10.1002/fft2.65.

1264 Colombo, G. M., Marreiro Gomes, R. M., Muñoz Buitrago, S. A., Buitrago Ramírez,
1265 J. R., de Sousa Araujo, A. C., Silva Oliveira, F. P. & Monserrat, J. M. (2023). Effects of
1266 Lyophilized Açai (*Euterpe oleracea*) Supplementation on Oxidative Damage and
1267 Intestinal Histology in Juvenile Shrimp *Penaeus vannamei* Reared in Biofloc
1268 Systems. *Animals*, 13(20), 3282. <https://doi.org/10.3390/ani13203282>.

1269 Deng, J., Yang, H., Capanoglu, E., Cao, H., & Xiao, J. (2018). Technological aspects
1270 and stability of polyphenols. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, 295–
1271 323. doi:10.1016/b978-0-12-813572-3.00009-9.

1272 Fan, J., Zhang, Y., Zhou, H., Liu, Y., Cao, Y., Dou, X., & Tan, B. (2023). Dietary
1273 Malondialdehyde Damage to the Growth Performance and Digestive Function of Hybrid
1274 Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus*♂). *Animals*, 13(19), 3145.
1275 <https://doi.org/10.3390/ani13193145>.

1276 Filipe, D., Gonçalves, M., Fernandes, H., Oliva-Teles, A., Peres, H., Belo, I., &
1277 Salgado, J. M. (2023). Shelf-life performance of fish feed supplemented with bioactive
1278 extracts from fermented olive mill and winery by-products. *Foods*, 12(2), 305.
1279 <https://doi.org/10.3390/foods12020305>.

1280 Hematyar, N., Masilko, J., Mraz, J., & Sampels, S. (2018). Nutritional quality,
1281 oxidation, and sensory parameters in fillets of common carp (*Cyprinus carpio* L.)
1282 influenced by frozen storage (-20 °C). *Journal of Food Processing and Preservation*,
1283 42(5), e13589. doi:10.1111/jfpp.13589.

1284 Kim, A.-N., Kim, H.-J., Chun, J., Heo, H. J., Kerr, W. L., & Choi, S.-G.
1285 (2018). Degradation kinetics of phenolic content and antioxidant activity of hardy
1286 kiwifruit (*Actinidia arguta*) puree at different storage temperatures. *LWT*, 89, 535–
1287 541. doi:10.1016/j.lwt.2017.11.036.

1288 Koltover, V. K. (2018). Antioxidant biomedicine: from chemistry of free-radicals to
1289 reliability of biological systems. *Rese Med Eng Sci*.

1290 Lee, S., Kim, M. G., Hur, S. W., Katya, K., Kim, K. W., & Lee, B. J. (2023).
1291 Assessment of Safety, Effects, and Muscle-Specific Accumulation of Dietary Butylated
1292 Hydroxytoluene (BHT) in *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*, 2023(1),
1293 1381923. <https://doi.org/10.1155/2023/1381923>.

1294 Li, H., Yang, D., Li, Z., He, M., Li, F., Jiang, J., Liu, Y. (2018). The effects of
1295 *Angelica sinensis* extracts on lipid oxidation in fish feeds and growth performance in
1296 juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Animal*
1297 *Nutrition*. doi:10.1016/j.aninu.2018.06.004.

1298 Mbewe, G., Nwanzi, K., Chibesa, M., Mphande, J., Mumbula, I., Bwalya, H.,
1299 Chibiya, R.C., Mbewe, J., Mweemba, M., Mwale, O., Simfukwe, K., Phiri, C.J., Muhala,
1300 V & Hasimuna, O.J. (2024) Efficacy of sodium bicarbonate (Baking soda) and clove
1301 powder (*Syzygium aromaticum*) as anaesthetic agents for Nile tilapia (*Oreochromis*
1302 *niloticus*, linnaeus 1758) juveniles, *Journal of Applied Animal Research*, 52:1, 2329567,
1303 DOI: 10.1080/09712119.2024.2329567.

1304 Morante, V. H. P., Copatti, C. E., Souza, A. R. L., da Costa, M. M., Braga, L. G. T.,
1305 Souza, A. M., Melo, J. F. B. (2021). Assessment the crude grape extract as feed additive
1306 for tambaqui (*Colossoma macropomum*), an omnivorous fish. *Aquaculture*, 544,
1307 737068. doi:10.1016/j.aquaculture.2021.737068.

1308 Muzammil, S.; Wang, Y.; Siddique, M.H.; Zubair, E.; Hayat, S.; Zubair, M.; Roy, A.;
1309 Mumtaz, R.; Azeem, M.; Emran, T.B.; (2022). Polyphenolic Composition, Antioxidant,
1310 Antiproliferative and Antidiabetic Activities of *Coronopus didymus* Leaf Extracts.
1311 Molecules, 27, 6263. <https://doi.org/10.3390>.

1312 Noreen, H., Semmar, N., Farman, M., & McCullagh, J. S. O. (2017). Measurement of
1313 total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant
1314 *Coronopus didymus*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 10(8), 792–
1315 801. doi:10.1016/j.apjtm.2017.07.024.

1316 Oliveira, V. D. De. (2021) Níveis de suplementação do aditivo alimentar VILIGENT™
1317 em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo: efeito na estrutura do epitélio intestinal e junção
1318 oclusiva .Dissertação de Mestrado (UFSC).

1319 Ouabou, R., Hssaini, L., Ennahli, S., & Alahyane, A. (2024). Evaluating the impact
1320 of storage time and temperature on the stability of bioactive compounds and microbial
1321 quality in cherry syrup from the ‘Burlat’ cultivar. Discover Food, 4(1), 83.

1322 Rakita, S. M., Čolović, D. S., Levart, A. R., Banjac, V. V., Čolović, R. R.,
1323 Dragojlović, D. M., & Đuragić, O. M. (2020). A rapid spectrophotometric method for
1324 determination of thiobarbituric acid reactive substances in rainbow trout feed. Food and
1325 Feed research, 47(1), 43-54.

1326 Rietjens, I. M. C. M., Boersma, M. G., Haan, L. de, Spenkelink, B., Awad, H. M.,
1327 Cnubben, N. H. P., ... Koeman, J. H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural
1328 antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. Environmental
1329 Toxicology and Pharmacology, 11(3-4), 321–333. doi:10.1016/s1382-6689(02)00003-0.

1330 Salami, S. A., Guinguina, A., Agboola, J. O., Omede, A. A., Agbonlahor, E. M., &
1331 Tayyab, U. (2016). Review: In vivo and postmortem effects of feed antioxidants in
1332 livestock: a review of the implications on authorization of antioxidant feed additives.
1333 Animals, 10(08), 1375–1390. doi:10.1017/s1751731115002967.

1334 Santos, L. G.; Martins, V. G. 2023 Optimization of the green extraction of
1335 polyphenols from the edible flower *Clitoria ternatea* by high-power ultrasound: a
1336 comparative study with conventional extraction techniques. Journal of Applied Research
1337 on Medicinal and Aromatic Plants, v. 33, p. 100458.,
1338 doi.org/10.1016/j.jarmap.2023.100458.

1339 Shefat, S. H. T., & Karim, M. A. (2018). Nutritional diseases of fish in aquaculture
1340 and their management: A review. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 2(12), 50-58.

1341 Sousa, D., Salgado, J. M., Cambra-López, M., Dias, A. C., & Belo, I.
1342 (2021). Degradation of lignocellulosic matrix of oilseed cakes by solid-state
1343 fermentation: fungi screening for enzymes production and antioxidants release. *Journal*
1344 *of the Science of Food and Agriculture*. doi:10.1002/jsfa.11490.

1345 Taşbozan, O., & Erbaş, C. (2023). Antioxidant Additives in Fish Feeds. *Black Sea*
1346 *Journal of Agriculture*, 6(3), 321-325. doi: 10.47115/bsagriculture.1246497.

1347 Uzombah, T. A. (2022). The implications of replacing synthetic antioxidants with
1348 natural ones in the food systems. In *Natural food additives*. IntechOpen.

1349 Van Doan , H; Lumsangkul, C ; Sringarm, K , Hoseinifar, S.H; Dawood, M.A.O; El-
1350 Haroun, E ; Harikrishnan, R; Jaturasitha, S; Paolucci, M. (2022) Impacts of Amla
1351 (*Phyllanthus emblica*) fruit extract on growth, skin mucosal and serum immunities, and
1352 disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised under biofloc system.
1353 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100953>.

1354 Waterhouse, A. L . (2002). Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in*
1355 *Food Analytical Chemistry* 6(1):1-8 doi : 10.1002/0471142913.fai0101s06.

1356 Yehye, W. A., Rahman, N. A., Ariffin, A., Abd Hamid, S. B., Alhadi, A. A., Kadir,
1357 F. A., & Yaeghoobi, M. (2015). Understanding the chemistry behind the antioxidant
1358 activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal*
1359 *Chemistry*, 101, 295–312. doi:10.1016/j.ejmech.2015.06.026.

1360 Yordi, E. G., Pérez, E. M., Matos, M. J., & Villares, E. U. (2012). Antioxidant and
1361 pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship
1362 evidence. *Nutrition, well-being and health*, 2, 23-48.

1363 Zhu, F. (2020). A review on the application of herbal medicines in the disease control
1364 of aquatic animals. *Aquaculture*, 735422. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.

1365

1366

1367

1368 **7. Conclusão Geral**

1369 Este estudo destaca a eficácia dos compostos bioativos extraídos sob condições
1370 ótimas, como 44,62% de álcool, uma razão solvente-massa de 100 mL/g, e uma
1371 temperatura de 85°C durante 120 min. Esses parâmetros proporcionaram um extrato com
1372 boa atividade antioxidante e antimicrobiana, sendo as variáveis de temperatura e
1373 concentração de álcool as mais influentes na recuperação de compostos fenólicos. Esses
1374 resultados oferecem diretrizes valiosas para o desenvolvimento de ingredientes funcionais
1375 para indústrias como a aquicultura, alimentos, farmacêutica e cosmética.

1376 Nas rações, pode-se observar que, apesar do efeito inicial protetor dos extratos e
1377 do BHT em dietas de aquicultura, inibindo a peroxidação lipídica nos primeiros dias de
1378 armazenamento, a eficácia antioxidante diminuiu ao longo do tempo. Observou-se que o
1379 controle, os extratos nas concentrações de 50 mg/kg, 100 mg/kg (equivalente de BHT) e
1380 o BHT a 100 mg/kg apresentaram valores intermediários, sem diferenças significativas
1381 entre si. Já a concentração mais alta de 200 mg/kg apresentou uma tendência a valores
1382 mais elevados de peroxidação lipídica. Os resultados indicam que não houve uma
1383 concentração ideal com eficácia significativamente superior em relação ao controle na
1384 oxidação lipídica e atividades antioxidantes ao longo do tempo. Esses dados indicam
1385 que, apesar do efeito antioxidante inicial, os compostos bioativos, sejam eles naturais ou
1386 sintéticos, perdem sua capacidade protetora ao longo do tempo, exigindo novas
1387 estratégias para garantir sua eficácia prolongada.

1388