

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Avaliação da atividade imunológica,
metabólica e de estresse de pacus
(*Piaractus mesopotamicus*) alimentados
com *Aloe vera* e desafiados com
*Aeromonas hydrophila***

Rudney Weiber Silva de Assis

Jaboticabal, São Paulo
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Avaliação da atividade imunológica,
metabólica e de estresse de pacus
(*Piaractus mesopotamicus*) alimentados
com *Aloe vera* e desafiados com
*Aeromonas hydrophila***

Rudney Weiber Silva de Assis

Orientador: Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo
2020

A848a	Assis, Rudney Weiber Silva de Avaliação da atividade imunológica, metabólica e de estresse de pacus (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) alimentados com Aloe vera e desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i> / Rudney Weiber Silva de Assis. – Jaboticabal, 2020 88 p. : tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati 1. Aloe vera. 2. resposta imune. 3. plantas medicinais. 4. estresse. 5. metabolismo. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

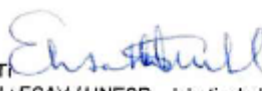
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação da atividade imunológica, metabólica e de estresse de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com *Aloe vera* e desafiados com *Aeromonas hydrophila*

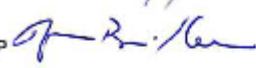
AUTOR: RUDNEY WEIBER SILVA DE ASSIS

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

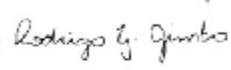
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI 
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. JOÃO BATISTA KOCHENBORGER FERNANDES 
Laboratório de Peixes Ornamentais / Centro de Aquicultura - CAUNESP

Profa. Dra. LAQUELINE DALBELLO BILLER 
Departamento de Zootecnia-FCAT/UNESP / Dracena/SP

Pós-Doutorando EDUARDO PAHOR FILHO 
./ Centro de Aquicultura - CAUNESP

Prof. Dr. RODRIGO YUKIHIRO GIMBO 
./ Universidade Nilton Lins, Manaus-AM

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2020

“...Lembre da minha ordem: Seja forte e corajoso!
Não fique desanimado, nem tenha medo, porque Eu,
o Senhor, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar
para onde você for...”

Josué 1:9

Agradecimentos

Não poderia não começar agradecendo ao meu melhor amigo, a quem me sustentou e me encorajou todas as vezes que pensei em desistir, me mostrando que tem um plano para tudo isso. Eu ainda não sei qual é, mas continuo acreditando nele. Ao meu Deus e melhor amigo eu agradeço muito.

A minha família que sempre me apoiou e acreditou em mim e que este dia chegaria. Sem vocês eu nem chegaria perto de estar aqui. Não poderia deixar de agradecer especialmente a minha mãe que desde o início desta jornada esteve me incentivando, acreditando em mim e me patrocinando por todos estes anos. Eu imagino quantas coisas se privou para me ajudar, eu sinceramente quero poder retribuir tudo o que fez por mim. Eu conseguirei!

A minha querida e muito apreciada orientadora, prof^a Elisabeth Urbinati, que me recebeu como um filho em seu laboratório me ensinando tantas coisas que levarei para o resto da vida. Eu a considero como uma mãe. Minha orientadora me ensinou até sem falar uma palavra. Seus ensinamentos acadêmicos e principalmente pessoais irão me acompanhar por toda a vida. Quero poder estar velhinho e contar para todo mundo como foi ser orientado por uma mulher tão humana.

Eu me sinto uma pessoa muito privilegiada por tanta gente boa que conheci neste capítulo da minha vida que é pós-graduação. Fui adotado por algumas famílias que verdadeiramente me acolheram como filho, mas eu não poderia deixar de agradecer por uma família em especial. Minha mãe Marihelp e meu pai Jovem. Eles foram meu suporte quando a vontade de um colo de pais batia forte e eu não tinha. Não consigo não ver a mão de Deus e seu cuidado comigo me dando de presente pessoas tão especiais. Eles estão tatuados em meu coração! É pra sempre, são minha família. Aos meus irmãos Renato e Miriam, por estarem sempre comigo topando me ajudar seja qual for a hora e momento, muito obrigado.

A minha família que me acolheu tão bem, que são todos os meus amigos e irmãos da Igreja Adventista do Sétimo Dia. Vocês fizeram com que meus dias se tornassem bem mais leves ao longo desta caminhada de anos, sorrindo comigo, as vezes chorando, mas sempre orando comigo. Eu me sinto em família verdadeiramente. Guardarei vocês pra sempre no meu coração! Em especial quero agradecer a minha amiga do peito Mariane Macioli que foi sempre minha ajuda incansável, seja lá para o que for. Uma parceria assim quem tem é privilegiado. Agradeço a Deus por sua vida, minha amiga! Obrigado!

A minha amigona Damarinha, por todos estes anos divertidos, de aprendizado e trabalho. Obrigado por ser as vezes mais que amiga, por me defender quando precisava e também me aconselhar! Obrigado por toda a parceria, você mora no meu coração.

A todos os meus amigos que adquiri nesses anos morando em Jaboticabal, vocês me acolheram tão bem e me ensinaram acima de tudo a ser uma pessoa melhor e mais humana. Não posso listar, pois posso esquecer de alguém. Meu muito obrigado a todos vocês!

A todos os meus companheiros de laboratório durante toda a realização do trabalho, pelos longos dias de coletas e análises, mas sempre de muitas risadas. Muito obrigado!

A todos os amigos, funcionários, professores e colegas do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP pela ajuda e amizade quando precisei.

Aos funcionários do CAUNESP Valdecir e Márcio, que sempre foram tão prestativos em me ajudar. Obrigado por toda a força desde o início! Vocês são muito

especiais! Me fizeram rir e até me deixaram mais conhecido do que desejaria no CAUNESP.

Apoio Financeiro

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Sumário

Resumo	10
Abstract	11
CAPÍTULO 1	12
Considerações Gerais	12
1. Panorama da Aquicultura	13
1.2 Sistema Imune de peixes	17
1.3 Alternativas de redução do estresse e manutenção da saúde	19
1.4 Imunoestimulantes	20
1.5 Plantas como imunoestimulantes	21
1.6 Aloe vera	24
1.7 Modelo Biológico	27
2. Objetivos	28
2.1 Geral	28
2.2 Específicos	28
3. Referências Bibliográficas	29
CAPÍTULO 2	45
Physiological activity of Aloe vera in pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) inoculated with <i>Aeromonas hydrophila</i>	47
ABSTRACT.....	48
Introduction	48
Material and methods.....	49
Results.....	53
Discussion	54
Conclusions	58
References	58
CAPÍTULO 3	68
Avaliação da atividade imunológica, metabólica e de estresse de pacus (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) alimentados com Aloe vera e desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	69
Resumo	69
Abstract.....	69
Introdução.....	70
Material e métodos	71
Resultados.....	75
Discussão.....	80
Referências.....	84
CAPÍTULO 4	88
Considerações finais	89

Resumo

A presente tese de Doutorado compreende dois experimentos e é apresentado em quatro capítulos. No primeiro, apresentamos uma introdução geral sobre o tema da tese e no último as considerações finais. Os capítulos que compõem o restante da tese foram escritos como artigos científicos. No primeiro experimento, capítulo 2, foi avaliada a resposta imune inata, de estresse e metabólica de juvenis de pacu alimentados com diferentes concentrações de extrato de *Aloe vera* (0,0%; 0,5%; 1,0% e 2,0%), durante 7 dias. Depois da alimentação, os peixes foram inoculados através de injeção intraperitoneal (IP) de *Aeromonas hydrophila* inativada. Os peixes foram amostrados antes, 3h, 6 h e 24 h após o desafio. Os resultados mostraram que todas as concentrações de *A. vera* reduziram os níveis basais de cortisol e que, 3 h após a inoculação bactéria, os menores valores de cortisol foram observados nos peixes alimentados com 1,0% do extrato. Após 7 dias de alimentação, em condição basal, a *A. vera* promoveu os valores mais elevados de atividade respiratória dos leucócitos circulantes (ARL) nos peixes alimentados com 0,5% e 1,0% do extrato da planta. Os níveis séricos de lisozima aumentaram seis horas após a inoculação bacteriana em peixes alimentados com 1,0% e 2,0% de *A. vera*. O sistema complemento foi ativado nos peixes que receberam 1% de extrato da planta em todas as amostragens após a inoculação da bactéria. A alimentação por 7 dias com 1,0% de *Aloe vera* aumentou os níveis lipídicos no fígado e músculo. O segundo experimento, capítulo 3, avaliou a inclusão de *A. vera* na dieta (0,0%;0,5%;1,0% e 2,0%) por um período de alimentação de 15 dias seguida por desafio dos peixes com injeção IP de *A. hydrophila* inativada. Os peixes foram amostrados antes, 3, 6 e 24 horas após o desafio. Os dados deste experimento compõem o capítulo 3. Os resultados mostraram elevação do cortisol circulante causado pelo inóculo, em todos os tratamentos, e confirmaram o efeito redutor dos níveis de cortisol da *A. vera*, observado nas condições experimentais deste experimento, 3 horas após o inóculo. Observamos elevação das concentrações plasmáticas de glicose 3 h após inoculação da bactéria e redução maior que do grupo controle nos peixes que receberam o extrato de *A. vera*. As concentrações da lisozima sérica de peixes controle aumentaram 3 h após inoculação e se mantiveram até 24 h. Nos peixes que receberam extrato de *A. vera* esse aumento foi inibido às 3 h, mas se elevaram a partir de 6 h, sendo o valor mais alto observado nos peixes que receberam 2,0% do extrato, 24 h após inoculação. Observamos, ainda, efeito do extrato de *A. vera* que aumentou a quantidade de lipídeo no músculo e depósito visceral. Em conjunto, os dados apresentados nesta tese indicam que o extrato de *A. vera* tem ações redutora de estresse, imunostimulante e lipogênica em juvenis de pacu, com pequena variação no tempo de detecção de seus efeitos quando a alimentação é oferecida por 7 ou 15 dias. Isto nos permite sugerir o uso desta planta como suplemento na alimentação do pacu como protocolo alternativo para reforçar e melhorar os mecanismos de defesa imune, reduzir surtos de doenças e aumentar a resistência dos peixes, ou em períodos em que o peixe necessita poupar os estoques de energia, sem prejuízos para o peixe, para o consumidor e para o meio ambiente.

Palavras-chave: *Aloe vera*, resposta imune, plantas medicinais, estresse, metabolismo

Abstract

This Doctoral thesis comprises two experiments and is presented in four chapters. In the first, we present a general introduction on the topic of the thesis and in the last, the final considerations. The chapters that make up the rest of the thesis were written as scientific articles. In the first experiment, chapter 2, the innate, stress and metabolic responses of pacu juveniles fed different concentrations of *Aloe vera* extract (0.0%; 0.5%; 1.0% and 2.0%) were evaluated, for 7 days. After feeding, the fish were inoculated by intraperitoneal (IP) injection of inactivated *Aeromonas hydrophila*. The fish were sampled before, 3h, 6h and 24h after the challenge. The results showed that all concentrations of *A. vera* reduced baseline levels of cortisol and that, 3 h after bacterial inoculation, the lowest values of cortisol were observed in fish fed 1.0% of the extract. After 7 days of feeding, in basal condition, *A. vera* promoted the highest values of respiratory activity of circulating leukocytes (ARL) in fish fed with 0.5% and 1.0% of the plant extract. Serum lysozyme levels increased six hours after bacterial inoculation in fish fed 1.0% and 2.0% *A. vera*. The complement system was activated in fish that received 1% of plant extract in all samples after inoculation of the bacteria. Feeding for 7 days with 1.0% *Aloe vera* increased lipid levels in the liver and muscle. The second experiment, chapter 3, evaluated the inclusion of *A. vera* in the diet (0.0%; 0.5%; 1.0% and 2.0%) for a 15-day feeding period followed by a fish challenge with IP injection of inactivated *A. hydrophila*. The fish were sampled before, 3, 6 and 24 hours after the challenge. The data from this experiment comprise chapter 3. The results showed an increase in the circulating cortisol caused by the inoculum, in all treatments, except in fish fed with 2% *A. vera*, confirmed the reducing effect of the extract on cortisol levels, observed in the experimental conditions of this experiment. We observed elevation of glucose plasma concentrations, with a reduction 6 h after bacterial inoculation, more intensely in fish fed with the extract. The serum lysozyme concentrations of control fish increased 3 h after inoculation and were maintained up to 24 h. In fish that received *A. vera* extract, this increase was inhibited at 3 h, but increased after 6 h, the highest value being observed in fish that received 2.0% of the extract, 24 h after inoculation. We also observed an effect of *A. vera* extract that increased the amount of lipid in the muscle and visceral deposit. Taken together, the data presented in this thesis indicate that *A. vera* extract has stress-reducing, immunostimulating and lipogenic actions in pacu juveniles, with little variation in the time of detection of its effects when feeding is offered for 7 or 15 days. This allows us to suggest the use of this plant as a supplement in pacu feeding as an alternative protocol to reinforce and improve immune defense mechanisms, reduce disease outbreaks and increase fish resistance, or in periods when the fish needs to preserve their energy reserves, without impairment to fish health, to the consumer and to the environment.

Keywords: *Aloe vera*, immune response, medicinal plants, stress, metabolism

CAPÍTULO 1

Considerações Gerais

1. Panorama da Aquicultura

Ao longo das últimas décadas, a humanidade vem enfrentando desafios para fornecer alimentos e meios de subsistência a uma população que vem crescendo cada vez mais, ultrapassando, no século XXI, mais de 7 bilhões de pessoas. Com a pesca relativamente estável, desde o final dos anos 80, a aquicultura tem sido responsável pelo crescimento contínuo no suprimento de peixe para consumo humano (FAO, 2018). Desde 1961, o crescimento global anual do consumo de peixes tem sido duas vezes maior que o crescimento da população, e, a partir de 2012, vem recebendo destaque ao ultrapassar a produção de carne bovina (Earth Policy Institute, 2013). A aquicultura é uma das principais fontes de proteína para a segurança alimentar no mundo, além de ser considerada uma atividade geradora de trabalho e ingresso de muitos países ao desenvolvimento (FAO, 2016).

Em 2016, a produção da aquicultura mundial atingiu 90,63 bilhões de toneladas, representando 53% de toda a produção de peixes, com um valor estimado de 243,5 bilhões de dólares (FAO, 2018). Entre 1961 e 2016, o aumento anual médio no consumo global de peixes ultrapassou o crescimento da população, e foi maior que o aumento do consumo da carne de todos os animais terrestres combinados (FAO, 2018). Neste contexto, a aquicultura continental também vem crescendo de forma expressiva. Em 2016, sua produção foi de 64,2% do total da produção da aquicultura mundial, sendo que 37 países produziram mais peixes do que os capturados na natureza. A América Latina e a África detêm a marca de maior crescimento da aquicultura nos últimos anos (FAO, 2018).

O Brasil, acompanhando o crescimento mundial, vem apresentado avanços importantes. Só em 2018, produziu mais de 722 mil toneladas (Peixe BR, 2019). O país possui inúmeras bacias hidrográficas e mais de trinta espécies nativas, com os mais variados hábitos alimentares, que apresentam alto potencial para produção, crescimento rápido, boa conversão alimentar, rusticidade e demanda pelo mercado consumidor. Em todas as regiões do país, a produção de espécies nativas vem crescendo. Os peixes redondos ocupam lugar de destaque, e a soma da produção de pacu, tambaqui e do híbrido tambacu, por exemplo, alcança o segundo lugar nacional, atrás somente da tilápia (Peixe BR, 2019).

Para obter esse crescimento, a aquicultura, em todo mundo, tem recorrido, cada vez mais, à intensificação dos sistemas produtivos (Urbinati e Carneiro 2004). Porém,

nestes sistemas, o aumento da frequência das práticas de manejo resulta em estresse nos peixes, pois os animais enfrentam situações muito diferentes das encontradas no ambiente natural, estando sujeitos a maior susceptibilidade às doenças, sem contar com o impacto ambiental, e devem receber atenção especial, pois podem prejudicar a produtividade (Urbinati e Carneiro, 2004). Sistemas mais intensivos, pelo caráter potencialmente estressor, estimulam os animais a desenvolverem mecanismos fisiológicos adaptativos para enfrentarem tais situações. As respostas adaptativas são eficientes dependendo do tempo de exposição dos animais às condições desfavoráveis e podem tornar-se mal adaptativas pela cronicidade da exposição. O limite de tolerância para as condições adversas é específico, e quanto mais próximo a este o peixe chegar, maiores serão os efeitos deletérios sobre a saúde e bem-estar dos animais (Wedemeyer, 1996; Iwama et al., 1997).

1.1 Estresse em peixes

A definição de estresse vem sendo discutida por muito tempo. Cannon, em 1929, criou o termo "homeostase", que ele definiu como uma propriedade de seres vivos que lhes permite regular seu ambiente interno para manutenção através de ajustes compensatórios e antecipatórios do próprio organismo, para aumentar a probabilidade de sobrevivência do animal. Com base nos estudos de Cannon, Hans Selye (1936) pôde estabelecer um conceito chamado de Síndrome de Adaptação Geral, segundo a qual a resposta ao estresse apresenta diferentes estágios, com uma rápida reação de alarme, por ativação imediata do sistema adrenomedular simpático, seguido de reação prolongada de adaptação e resistência, por ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e, por fim, um estágio final de exaustão e até morte, dependendo da intensidade da cronicidade da resposta. Mais tarde, Pickering (1981), estudando estresse em peixes, definiu o fenômeno como sendo uma condição de quebra ou perturbação do equilíbrio dinâmico do organismo por estímulos, internos ou externos, denominados estressores. Barton e Iwama (1991), corroborando o conceito anterior, afirmaram que as respostas de estresse são reações a um estímulo danoso que pode influenciar na alteração da homeostasia fisiológica do peixe. Já em 1997, Barton ainda afirmou que o estresse é a resposta de um organismo a qualquer estímulo, extrínseco ou intrínseco, que altere o estado de repouso em que o organismo se encontra, ou seja, é uma condição de quebra do equilíbrio fisiológico, mais conhecido como homeostase, que permite ao animal sobreviver e tentar se adaptar as novas mudanças na condição. Desta forma, a resposta de estresse é uma reação adaptativa

que promove a melhor chance de sobrevivência diante de uma situação nociva ou desafiadora (Jobling, 1994).

Os métodos de produção intensiva, de modo geral, induzem a ocorrência de estresse nos animais e favorecem a ação de patógenos oportunistas que podem provocar, de forma aguda, mortandade nos sistemas de piscicultura (Richards e Roberts, 1978). Segundo Barton (1997), as práticas de produção intensiva de manejo causam consequências deletérias tanto ao sistema imunológico como ao metabolismo do animal, e que o estresse induzido por tais práticas é um fator importante que afeta o sucesso dos programas de produção de peixes, pois torna os animais mais suscetíveis a ação de micro-organismos patogênicos. Como já citado, a resposta de estresse apresenta três estágios: a reação de alarme como resposta primária, estado de resistência como resposta secundária e a exaustão como resposta terciária, e cada um indica a fase de alteração provocada no organismo pelo agente estressor.

Na figura 1, encontram-se, de forma simplificada, as etapas da resposta de estresse.

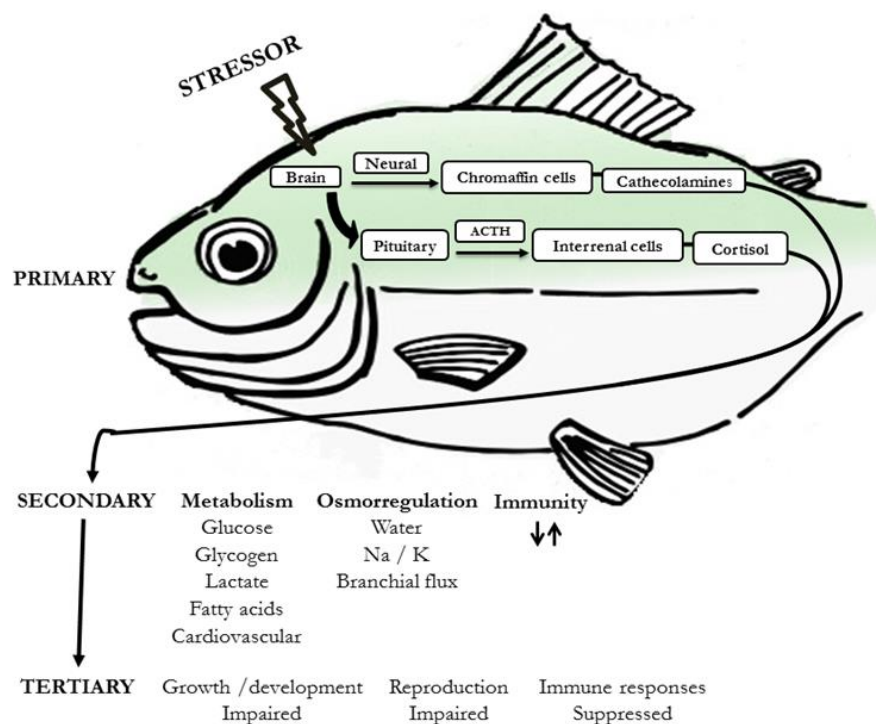


Figura 1: Esquema das respostas primárias, secundárias e terciárias do estresse em peixes [Urbinati et al. (2020), adaptado de Schreck e Tort, 2016].

A resposta primária de estresse nos peixes inicia-se com o reconhecimento do agente estressor, que induz uma resposta neuroendócrina em cascata (Schreck e Tort, 2016), iniciando com ativação de centros cerebrais e a secreção e síntese de diferentes hormônios (catecolaminas, principalmente adrenalina e noradrenalina), seguido por ativação do eixo simpático-cromafim; e em seguida ativação do eixo hipotálamo-pituitária-tecido interrenal e liberação do CRH (hormônio liberador de corticotrofina), no hipotálamo, ACTH (hormônio adrenocorticotrofina), na pituitária e o corticosteroide cortisol, e compostos relacionados, no tecido interrenal. Como consequência das reações primárias, ocorrem alterações metabólicas, iônicas e imunológicas que se caracterizam como reações de respostas secundárias do estresse, de caráter adaptativo.

As alterações secundárias ocorrem em uma escala de tempo mais lenta que as respostas primárias (Schreck e Tort, 2016). Dentre as respostas secundárias, estão as respostas cardiovasculares e respiratórias (Rodnick e Planas, 2016), que aumentam a distribuição de oxigênio pelo corpo; as respostas metabólicas, como alterações na glicemia (Barton, 2002), no ácido lático (Wood et al., 1983) e no glicogênio hepático e muscular; as respostas hematológicas, como alteração no número de células vermelhas e brancas e, ainda, as respostas hidroeletrólíticas, como alterações nas concentrações plasmáticas de íons (cloro, sódio, potássio), proteínas e na osmolaridade (Wendelaar Bonga, 1997; Takei e Hwang, 2016). Estas alterações têm como principal função disponibilizar energia para os tecidos para atender a demanda da nova condição do organismo (Urbinati et al., 2014). As concentrações de glicose e cortisol no sangue são os dois principais indicadores utilizados para a quantificação de estresse em peixes (Mommsen et al., 1999; Barton, 2002; Pottinger, 2008; Wendelaar Bonga, 2011).

Para que as respostas terciárias de estresse se instalem, a condição estressante deve perdurar por um período de tempo longo. Elas se caracterizam como uma fase de esgotamento fisiológico, trazendo prejuízos para o crescimento, reprodução e resistência imunológica, predispondo os peixes à doenças (Wendelaar Bonga, 2011; Mommsen et al., 1999; Urbinati e Carneiro, 2004; Urbinati et al., 2014; Sadoul e Vijayan, 2016). Portanto, o organismo possui competência para se adaptar a condições adversas de estresse, porém quando os mecanismos de resposta se esgotam, as alterações no organismo podem ser deletérias (Barton e Iwama, 1991).

Entre os sistemas fisiológicos prejudicados pelo agente estressor em condição crônica, está o sistema imune, cuja alteração pode comprometer toda a saúde do organismo, pois este sistema atua como uma barreira de proteção contra agentes patogênicos, que por si, podem se comportar como fatores de estresse no organismo.

1.2 Sistema Imune de peixes

Segundo Secombes e Wang (2012), o sistema imunológico é um complexo formado por componentes celulares e humorais, capazes de distinguir os elementos próprios do organismo daqueles impróprios, e que agem contra substâncias estranhas (Tizard, 2002), tais como microrganismos, toxinas ou células malignas (Bayne e Gerwick, 2001). Desta forma, representa um sistema eficaz de defesa contra microrganismos que penetram no organismo ou contra células malignas, função de defesa essencial contra o desenvolvimento de infecções e tumores. O sistema imune dos peixes se comporta semelhantemente aos dos mamíferos (Sakai, 1999) e de outros vertebrados (Beaman *et al.*, 1999; Saurabh e Sahoo, 2008).

O sistema imune de peixes apresenta respostas imunes inatas ou não específicas, que são as respostas de defesa que funcionam como uma primeira barreira contra infecções, independentemente do tipo de patógeno, e respostas imunes adaptativas ou específicas, que atuam de forma mais lenta, pois são dependentes do reconhecimento de antígenos, com produção de anticorpos específicos e memória imunológica (Bernstein *et al.*, 1998). Os peixes possuem mecanismos não específicos de defesa dos invertebrados, como a fagocitose desenvolvida por macrófagos e leucócitos granulares, e também são os primeiros animais a desenvolver resposta celular e humoral através de linfócitos (Verlhac e Gabaudan, 2000). Embora as respostas inatas e adaptativas tenham papel fundamental na defesa contra os agentes patogênicos, a resposta imune inata em peixes é mais importante em relação à adquirida quando comparado aos mamíferos (Urbinati e Carneiro, 2004; Saurabh e Sahoo, 2008; Urbinati *et al.*, 2014). As células de defesa dos peixes teleósteos são produzidas por tecidos e órgãos linfoides como o rim, timo, baço, e tecidos linfoides associados à mucosa. O rim nos peixes tem função semelhante à da medula óssea em mamíferos, como um órgão hematopoiético (Torroba e Zapata, 2003; Urbinati *et al.*, 2014). O timo tem função de desenvolvimento e maturação de linfócitos T (Bowden *et al.*, 2005) e no baço ocorre a produção de linfócitos e macrófagos (Urbinati *et al.*, 2014).

Já os tecidos linfoides associados à mucosa, que incluem os tecidos da mucosa do trato gastrointestinal, brânquias e pele, além de serem responsáveis pela produção de macrófagos, linfócitos, mastócitos e granulócitos (Bowden et al., 2005; Urbinati et al., 2014), produzem muco que contém importantes proteínas que atuam na defesa contra invasores, como a lisozima e proteínas do sistema complemento (Dalmo et al., 1997). Diferente dos mamíferos, o muco encontrado na pele dos peixes, brânquias e mucosa do trato gastrointestinal, representa um importante mecanismo de defesa não específico que tem como função prevenir a entrada de micro-organismos no corpo do animal.

O sistema complemento apresenta um papel de grande importancia na ligação entre as respostas imunes inatas e adquiridas nos peixes (Carroll, 2004; Hawlisch e Kohl, 2006), se constitui de cerca de 35 de proteínas séricas e de membrana, que participam de respostas inatas (via alternativa) e adquiridas (via clássica) (Holland e Lambris, 2002; Urbinati et al., 2014), e são produzidas no fígado e macrófagos teciduais. As proteínas do sistema complemento podem ser encontradas circulando na corrente sanguínea e como também em sua forma (Biller-Takahashi et al., 2012), porém é necessário ativá-las para que exerça suas funções, podendo acontecer a ativação pelas vias: alternativa, clássica e das lectinas.

A lisozima é uma das respostas inatas com mais estudos em peixes (Glynn, 1969; Jollé e Jollé, 1984), a sua concentração ou atividade se apresenta como um ótimo indicador da imunidade inata (Saurabh e Sahoo, 2008), por apresentar grande importância contra a invasão microbiana. Estas proteínas são sintetizadas no fígado e em locais extra-hepáticos, no entanto, a cinética de síntese e secreção ainda não está clara (Bayne e Gerwick, 2001). Sua produção é feita por leucócitos, principalmente monócitos e neutrófilos (Ellis, 1999, Murray e Fletcher, 1976), sendo encontrada no muco, saliva e sangue (Saurabh e Sahoo, 2008). A lisozima apresenta ação bacteriolítica, atua na digestão de carboidratos presentes na parede bacteriana, mecanismo de opsonização, bem como, atividade antiviral (Saurabh e Sahoo, 2008).

A atividade respiratória de leucócitos ou “burst” oxidativo acontece pelo aumento do oxigênio molecular originado na fagocitose, que durante este processo, há produção de espécies reativas de oxigênio – EROs, conhecidos como radicais livres, e esses compostos formam potentes bactericidas para combater microrganismos (Rauta et al., 2012; Biller-Takahashi et al., 2015). No “burst”

oxidativo ocorre a redução de O₂ - em H₂O₂, após ocorre liberação de radicais OH⁻, H₂O e cloraminas, e essas espécies reativas de oxigênio agem destruindo agentes infecciosos. (Verlhac et al., 1998).

1.3 Alternativas de redução do estresse e manutenção da saúde

Respostas agudas de estresse, como as que ocorrem nas fases primária e secundária, parecem aumentar a imunidade inata, enquanto condições mais prolongadas reduzem a imunocompetência (Dhabhar, 2000). A procura por estratégias de redução do estresse e suas consequências negativas nas práticas de piscicultura para garantir o bem-estar e a saúde dos peixes vem crescendo e se revestindo de importância para a melhoria da produtividade. Várias substâncias foram e são utilizadas na tentativa de modulação do estresse e/ou preparo do organismo para os desafios, sejam eles físicos, químicos ou biológicos. Algumas técnicas têm sido utilizadas na tentativa de redução do estresse dos animais cultivados, tais como uso de anestésico (MacAvoy e Zaepfel, 1997; Griffiths, 2000, Urbinati e Carneiro, 2001; Carneiro e Urbinati, 2001b; Pirhonen, e Schreck, 2003; Small, 2003), utilização de sal (Wurts, 1995; Carneiro e Urbinati, 2001a), entre outros.

O uso de antibióticos também é comum no manejo da produção de peixes, no controle de doenças. A utilização de forma inadequada e geralmente indiscriminada destas substâncias normalmente ocorre quando não é conhecido o agente causador do surto da doença (Miranda, 2012). Os agentes podem ser de diversas formas de infecção, como tanto bactérias Gram-positivas, quanto as Gram-negativas. Tais medidas, muitas vezes impensadas, podem provocar a seleção e a resistência dos patógenos (Klaenhammer e Kullen, 1999; Kutzepa et al., 2009), além de ser uma fonte de poluição ambiental (Boyd e Massaut, 1999) por vários fatores como lixiviação de alimentos não consumidos (Capone et al., 1996), pela excreção urinária e fecal dos animais (Cravedi et al., 1987 ; Kemper, 2008), entre outros. Todos estes fatores podem afetar a saúde humana, pois muitos antibióticos usados na saúde animal são os mesmos usados na saúde humana, desta forma as bactérias poderão se tornar resistente também em humanos (Miranda et al., 2018; Milanao et al., 2011).

Além disso, pelo fato de que os antibióticos podem deixar resíduos na carne dos animais, diversos países baniram seu uso em cultivo. A União Europeia proibiu, a partir de janeiro de 2006, o uso de antibióticos na produção animal (Lückstädt, 2006). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013) já proibiu

o uso de diversos antibióticos como aditivo alimentar na produção animal. Dessa forma, cada vez mais, a profilaxia e prevenção se tornam itens essenciais nas pisciculturas e boas práticas sanitárias devem ser incorporadas pelos produtores para possibilitar o equilíbrio do cultivo e do ambiente. Assim, se faz necessário a intensificação no conhecimento de ferramentas que auxiliem a manutenção e conservação da higidez dos animais nos sistemas de produção, especialmente os intensivos.

1.4 Imunoestimulantes

Dentre várias estratégias para a solução desta problemática, os imunoestimulantes são considerados uma alternativa aos antibióticos para aumentar a imunidade dos peixes, combatendo efetivamente os patógenos. Segundo Bairwa et al. (2012), os imunoestimulantes promovem uma resposta imune mais eficaz aos agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos e parasitas). Eles ajudam a acelerar a maturação da imunidade inespecífica e específica em animais jovens suscetíveis.

O interesse no uso de tais substâncias como uma alternativa à utilização de medicamentos, produtos químicos e antibióticos está crescendo porque os imunoestimulantes são ecologicamente seguros, tem uma maior disponibilidade em diferentes partes do mundo (Galeotti, 1998; Sakai, 1999; Guardiola et al., 2016). A utilização em peixes tem grande importância como indutores de proteção contra doenças e estimuladores de mecanismos não específicos de defesa (Anderson, 1992). Eles agem, por exemplo, ativando as células brancas do sangue (leucócitos) e tornando o animal mais resistente à infecção por vírus, bactéria, fungos e parasitas (Raa, 2000). Portanto, o uso de imunoestimulantes na prevenção de doenças em peixes é uma área alternativa e promissora (Sakai, 1999).

Um imunoestimulante pode ser desde uma substância sintética, química ou até mesmo biológica que promova, de forma indireta, a ativação dos mecanismos de defesa inatos ou indiretamente adaptativos adaptativos (Saurabh e Sahoo, 2008), ativando de forma direta as células do sistema imune, melhorando a imunocompetência dos animais. Nos leucócitos, estas substâncias são ligadas à sua membrana e iniciam a ativação (Sakai, 1999). Como uma reação em cadeia, os imunoestimulantes ativam amplamente o sistema imunológico, ou seja, ativam monócitos, macrófagos e neutrófilos e amplificam a produção de linfócitos, anticorpos e lisozima (Sakai, 1999). Por estas características, a imunoterapia tem sido ativamente investigada por seu potencial como alternativa para

prevenção de doenças (Raa, 2000; Mohamad e Abasali, 2010), reduzindo efeitos negativos do estresse na piscicultura (Siwicki et al., 1998) e perda econômica (Chi et al., 2016; Guardiola et al., 2016).

Várias substâncias podem ser consideradas imunoestimulantes, sendo desde agentes químicos, componentes bactericidas e polissacarídeos, extratos de animais e vegetais, fatores nutricionais e citocinas. Entre eles, temos compostos sintéticos como levamisol; FK-565; MDP (dipeptídeo muramil) (Siwicki et al., 1990); polissacarídeos como quitina e quitosana (Siwicki et al., 1994; Sakai, 1999), extratos vegetais como própolis (Gunathilaka et al., 2015; Orsi et al., 2000) saponinas e glicirizina (Sakai 1999), babosa (Zanuzzo et al., 2017) e alho (Martins et al., 2002), hormônios como a prolactina e o hormônio do crescimento (Sakai et al., 1995) e componentes de parede celular de microrganismos como os lipopolissacarídeos (LPS) (Goetz et al., 2004), os peptídeoglicanos (Zhou et al., 2006) e os glucanos (Sakai, 1999; Chettri et al., 2013; Meena et al., 2013). Todos estes compostos podem ser de fácil administração nos animais, pois apresentam baixo potencial de toxicidade e ainda são capazes de serem administrados de diferentes formas, como imersão, injeção, ou até mesmo como suplemento alimentar (Smith et al., 2003), sendo esta uma alternativa muito eficiente e adequada para a piscicultura.

1.5 Plantas como imunoestimulantes

As pesquisas sobre o potencial de imunoestimulantes e fitoterápicos no tratamento de doenças e retorno a homeostase em peixes vem sendo encorajadas e ainda devem ser mais estudadas. Estas substâncias têm sua atividade descrita há séculos no tratamento de infecções bacterianas e infestações parasitárias de humanos e animais (Silva e Fernandes-Junior, 2010), sendo potenciais terapêuticos na higidez de peixes. Dentre várias substâncias naturais que estimulam o sistema imunológico, as plantas medicinais vêm ganhando o interesse do meio científico, não só por apresentarem, aparentemente, funções de ativação do sistema imune, mas também por outras funções, como promoção do crescimento, estimulação do apetite, controle de infestação parasitária, entre outras, devido aos princípios ativos, como saponinas, taninos, alcaloides, pigmentos flavonoides, fenólicos, mucilagem, glicosídeos, compostos fenólicos, flavonas, substâncias sulfurosas, terpenoides, esteroides e óleos essenciais, entre outros (Mukesh e Bairwa et al., 2012). As plantas conhecidas como medicinais apresentam ampla atividade antiparasitária, antibacteriana e antifúngica comprovada por estudos científicos em animais e humanos

(Silva e Fernandes-Júnior, 2010). Apesar das plantas medicinais já terem sido utilizadas como terapia e prevenção de doenças de humanos e animais há séculos, apenas recentemente tem sido discutido seu potencial para uso na aquicultura. Muito disso se deve à procura por novos produtos, substitutos aos medicamentos utilizados e que tem impacto direto no ambiente aquático.

De acordo com Bulfon et al. (2015), mais de 60 espécies diferentes de plantas medicinais foram estudadas para melhorar a saúde dos peixes e o manejo de doenças na aquicultura. Este uso continua tendo muita atenção e tornou-se objeto de investigações científicas aprofundadas (Galina et al. 2009; Chakraborty e Hancz, 2011; Harikrishnan, Balasundaram e Heo, 2011a).

Para a administração de plantas na aquicultura, três métodos foram estabelecidos, que são a injeção, imersão (através de banhos) e administração oral (geralmente adicionado a ração); no entanto, este último parece ser mais viável do ponto de vista prático. Cada método apresenta vantagens e desvantagens. O método de injeção se mostrou um método de administração rápido e muito eficaz, especialmente para peixes grandes (Ainsworth, 1994; Yoshida et al., 1995), embora seja trabalhoso, caro, estressante para os peixes e pouco prático para peixes pequenos (Harikrishnan et al., 2011; Sakai, 1999; Galindo-Villegas e Hosokawa, 2004). A imersão é outro método muito eficaz e aparenta ser mais prático para peixes pequenos, embora exija a preparação de grande quantidade de solução de imersão, o que pode ser caro. Por outro lado, tempo de exposição, número de repetição e diluição são fatores que precisam ser mais estudados (Galindo-Villegas e Hosokawa, 2004).

A administração oral é o método mais prático, mais difundido e preferível atualmente, por ser um método não estressante e aplicável a todos os tamanhos de peixe. Muitos autores demonstraram melhora nos parâmetros imunes inatos após a administração de plantas medicinais (Reverter et al, 2014; Harikrishnan et al., 2011; Hai, 2015; Dügenci e Arda, 2003; Vallejos-Vidal et al, 2016; Zanuzzo et al., 2017).

As plantas são fontes de produtos químicos mais seguros, baratos e de fácil acesso. Preparações à base de plantas são prescritas para curar várias doenças, pois contêm princípios ativos variados, com atividades antioxidantes e antimicrobiológicas (Prasad e Variyur Padhyoy, 1993). É conhecido que produtos vegetais naturais promovem várias atividades como anti-estresse, crescimento, estimulação do apetite, tônico e imunostimulante e têm propriedades e antimicrobianas na larvicultura de peixes e camarões devido aos princípios ativos como alcaloides, flavonoides, pigmentos,

fenólicos, terpenoides, esteroides e óleos essenciais (Citarasu et al., 2002; Sivaram et al. 2004).

As pesquisas com extratos de plantas adicionados à ração para peixes têm mostrado inúmeros benefícios como estimulante da digestão, alteração da microbiota intestinal, melhora na absorção dos nutrientes, antioxidantes, imunoestimulantes e antimicrobianos (Aly e Mohamed, 2010). Segundo Santos et al. (2009), os extratos de plantas são bastante utilizados em dietas de peixes, sendo que sua eficácia irá depender das diferentes formas de ação no organismo dos espécimes, das concentrações, dos princípios ativos e quantidades adicionadas às rações.

As plantas medicinais incluem ervas, especiarias, algas, compostos extraídos de ervas, medicamentos tradicionais chineses e produtos derivados de plantas comerciais (Hai, 2015). Vários são os estudos que relataram melhora dos parâmetros imunológicos em muitos peixes após a administração de plantas ou extratos medicinais, incluindo atividade fagocítica, atividade respiratória, óxido de nitrogênio, conteúdo de mieloperoxidase, atividade do sistema complemento, atividade da lisozima, atividade total de proteínas (globulina e albumina) e antiprotease, entre outros (Düğenci et al., 2003; Reverter et al, 2014; Harikrishnan et al., 2011; Hai, 2015; Düğenci e Arda, 2003; Vallejos-Vidal et al, 2016; Zanuzzo et al., 2017).

Além da diversidade de plantas utilizadas, elas são utilizadas em formas que vão desde extratos, óleos, pó, entre outras, e em tempos de administração diferentes. Entre as plantas utilizadas podemos citar: o manjeriço (*Ocimum basilicum*) (Jayathirtha e Mishra, 2004), Solanum (*Solanum trilobatum*) (Nya e Austin, 2009), falsa margarida (*Eclipta alba*) (Christybapita et al., 2007), árvore triste (*Nyctanthes arbortristis*) (Logambal e Michael, 2000), alho (*Allium sativum*) (Amagase et al., 2001; Nya e Austin, 2009; Ndong e Fall, 2011; Talpur e Ikhwanuddin, 2012; Ghehdarijani et al., 2016), gengibre (*Zingiber officinale*) (Nya e Austin, 2009; Talpur et al., 2013; Nya e Austin, 2009), hortelã-pimenta (*Mentha × piperita*) (Talpur, 2014; Adel et al., 2016); agrião (*Nasturtium officinale*) (Asadi et al., 2012), cominho preto (*Nigella sativa*) (Awad et al., 2012), orégano (*Origanum vulgare*) (Pourmoghimi et al., 2015), alcaparra (*Capparis spinosa*) (Bilen et al., 2016), amêndoa (*Terminalia catappa*) (Chitmanat et al., 2005), flores de manjeriço (*Ocimum sanctum*) (Peraza-Gómez et al., 2011), farelo de sementes de cominho (*Carum carvi* L.) (Ahmad e Abdel-Tawwab, 2011), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) (Ahmad et al., 2011), ginseng (*Panax ginseng*) (Ashraf e Goda, 2008), Ginseng americano (*P. quinquefolium*) (Abdel-Tawwab, 2012), chá verde (*Camellia*

sinensis L.) (Abdel-Tawwab et al., 2010; Hwang et al., 2013), café em grão árabe, (*Coffee Arabica*) (Abdel-Tawwab, 2015), goiaba (*Psidium guajava*) (Direkbusarakom, 2004), semente de lua de folhas do coração (*Tinospora cordifolia*) (Sudhakaran et al., 2006), folha de oliveira (*Olea europaea*) (Micol et al., 2005), papaia (Penaflorida, 1995), flor roxa (*Echinacea purpurea*) (Aly e Mohamed, 2010), Saponina de quilaia (*Quillaja saponaria*) (Francis et al., 2005), algas marinhas (*Sargassum spp.*) (Immanuel et al., 2010) e tulsi (*Ocimum sanctum*) (Logambal et al., 2000).

1.6 Aloe vera

Além de todas estas plantas citadas, a *Aloe vera* é uma planta medicinal muito importante e tradicional. Indígena da África e dos países do Mediterrâneo, tem sua história muito antiga desde relatos na Mesopotâmia (Atherton, 1997), civilizações árabes, grega, egípcia, romana, asiática e africana (Stevens, 1999). Já era utilizada há muitos anos, mesmo sem se comprovar ainda todos os benefícios da planta, que hoje estão sendo descobertos.

Como descrição botânica, é uma planta pertencente à família Liliaceae que inclui cerca de 15 gêneros e 800 espécies, e *Aloe barbadensis* Miller é considerado o mais biologicamente ativo. Segundo Chow et al (2005), é reconhecida como a verdadeira Aloe devido a sua utilização generalizada e por apresentar poderes curativos. Suas folhas são verdes, grossas, a parte mais interna da folha é um tecido claro, macio que consiste em grandes células de parênquima de paredes finas nas quais a água é mantida na forma de uma mucilagem viscosa (Pugh et al., 2001), constituída principalmente por água e polissacarídeos, além de 70 outras substâncias como vitaminas A, B, C, E, cálcio, potássio, magnésio e zinco, e alguns aminoácidos e enzimas (Teske e Trentini, 1997; Femenia et al., 1999; Carvalho, 2005; Surjushe et al., 2008)

O gel é muito utilizado como matéria prima na indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica e diversas técnicas são empregadas para sua conservação (Atherton, 1997; Eshun e He, 2004; Cunha, 2005). Na indústria de cosméticos e produtos de higiene pessoal, tem sido utilizado como material de base para a produção de cremes, loções, sabonetes, xampus, produtos de limpeza facial e outros produtos. Na indústria de alimentos, tem sido utilizado como fonte de alimentos funcionais e como ingrediente em outros produtos alimentícios, para a produção de bebidas. Na indústria farmacêutica, tem sido utilizado na fabricação de produtos tópicos, como pomadas e preparações em gel, na

produção de comprimidos e cápsulas (Eshun e He, 2004; He et al., 2006). Recentemente foram descobertas algumas propriedades do gel da planta e o extrato das folhas inteiras que auxiliam na melhora da biodisponibilidade de vitaminas coadministradas em seres humanos (Vinson et al., 2005).

A planta produz pelo menos seis agentes com funções anti-sépticas já comprovadas que é lupeol, ácido salicílico, nitrogênio da uréia, ácido cinamônico, fenóis e enxofre, porque conseguem combater ou controlar bactérias, fungos e vírus, uma explicação do porquê a planta eliminar infecções internas e externas. A planta contém pelo menos três ácidos graxos anti-inflamatórios que são colesterol, campesterol e β -sitosterol, muito eficazes no tratamento de queimaduras, cortes, arranhões, abrasões, reações alérgicas, artrite reumatoide, febre reumática, indigestão ácida, úlceras, além de muitas condições inflamatórias do sistema digestivo e outros órgãos internos, incluindo estômago, intestino delgado, cólon, fígado, rim e pâncreas. (Ascaño et al., 2010).

O Acemanano é um polímero de forma linear, constituído por monômeros de manose acetilados. É um polissacarídeo de armazenamento considerado como um dos principais ingredientes ativos da *Aloe vera* (Femenia, Sánchez, Simal, & Rosselló, 1999; Rodríguez et al., 2010). Este polissacarídeo tem sido amplamente divulgado (Pugh, 2001; Tan e Vanitha, 2004) por suas propriedades estimuladora da proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno, angiogênese e a produção fatores de crescimento (IGF's) que auxiliam numa cicatrização mais rápida (Oliveira et al., 2009; Atiba et al., 2011). Agem como fatores de crescimento e estimulam macrófagos a liberarem TNF α e IL-1, responsáveis pelos mecanismos citados (Krahwinkel e Boothe, 2006).

Vários trabalhos mostram atividades do acemanano como agente antiviral, imunomodulador, agente na redução de infecções oportunistas e no estímulo aos processos de cicatrização em humanos (Christiaki e Florou-Paneri, 2010; Ni, Turner, Yates e Tizard, 2004). Segundo Chow et al. (2005), este polissacarídeo estrutural ainda tem a função de estimular o sistema complemento.

Em carpa comum, o acemannan atuou como um imunoestimulante natural, exibindo atividade adjuvante e estimulando a renovação celular (hematopoiese) (Abdy et al., 2017), enquanto em truta, ele melhorou a atividade dos macrófagos em até dez vezes, e estimulou sua produção e a liberação de anticorpos (Haghighi et al., 2014).

Em “rockfish” (*Sebastes schlegeli*), alimentados com ração suplementada com 0.5% de *Aloe vera*, houve baixa mortalidade (1,7%) após infestação por *Vibrio alginolyticus*, em relação ao grupo controle (60%) (Kim et al. (1999). Abdy et al. (2017) mostraram que, quando comparados com adjuvantes tradicionais na vacinação, como o adjuvante de Freund, o gel de *Aloe vera* poderia ser usado como um adjuvante natural com efeitos positivos semelhantes ou até maiores na vacinação de carpa comum. A administração oral de *Aloe vera*, na concentração específica de 0,2%, em shirbot (*Barbus grypus*) em comparação com Echinacea melhorou algumas respostas imunes não específicas (Mesbah e Mohammadian 2016). Já Mahdavi et al. (2013) relataram que adicionar 0,5% de pó etanólico de *A. vera* na dieta melhorou o desempenho de crescimento da carpa comum.

Segundo Zanuzzo et al. (2015b) houve uma melhor resposta imune inata de matrinxã (*Brycon amazonicus*) após banhos com extrato de *A. vera*. Outro estudo relatou que depois de transporte em água contendo extrato de *A. vera* juvenis de matrinxã apresentaram aumento da atividade respiratória de leucócitos (Zanuzzo et al., 2012). A administração oral de 0,1% e 0,5% do extrato da planta para peixes-rock juvenis naturalmente infectados com *Vibrio alginolyticus* melhorou a resistência às bactérias e melhorou os parâmetros imunes inatos (atividades de lisozima e explosão respiratória) (Kim et al., 1999). Zanuzzo et al. (2015) mostraram que a truta prateada (*Oncorhynchus mykiss*), alimentada com 0,5% de *A. vera* durante 8 semanas, apresentou níveis de cortisol em repouso mais baixo do que os peixes que não receberam o extrato da planta, especificamente metade a menos. Porém os parâmetros de imunidade e estresse não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si, apenas numéricas.

Mahdavi et al. (2013), quando trabalharam com alimentação de *Aloe vera* para carpa comum (*Cyprinus carpio*) por 8 semanas afirmam que o extrato de *Aloe vera* tem influência efetiva no desempenho produtivo, pode atuar como promotor de crescimento, estimulador de apetite e imunoestimulante, redutor de estresse, redutor de perdas de alimentos e proteger os peixes a fim de melhor desenvolvimento. Semelhantemente, outro estudo relatou que a inclusão de *A. vera* na dieta em 1,0% efetivamente melhorou o desempenho de crescimento e a utilização de nutrientes de alevinos de *C. gariepinus* (Ibidunni et al., 2018). Da mesma forma, a inclusão de *A. vera* pura na dieta de tilápias GIFT (0,5% e 2,0% por kg) foi capaz de melhorar significativamente o desempenho de crescimento e utilização da ração dos peixes (Gabriel et al. 2015a).

Embora os benefícios do uso da *A. vera* em humanos seja bastante conhecida, em aquicultura os estudos são recentes e pesquisas adicionais são necessárias para melhor entender as propriedades biológicas desta planta e seu potencial como aditivo alimentar na produção de peixes, para que novos produtos sejam desenvolvidos, particularmente para as diferentes espécies de peixes nativos brasileiros, como por exemplo o pacu.

1.7 Espécie Alvo

O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, espécie neotropical de água doce, pertence à ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Myleinae e gênero *Piaractus*, nativa da América do Sul, que se encontra distribuída nos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Saint-Paul, 1986). É considerada uma espécie de peixe rústica e onívora, com preferência a frugivoria e capacidade de utilização de diversos alimentos, se alimentando tanto de pequenos animais como também de folhas, caules, flores, frutos e sementes. É uma das espécies mais estudadas no Brasil (Urbinati et al., 2013), com fácil alevinagem, e sua pesca esportiva é muito apreciada. desta forma fazendo com que a espécie conquistasse lugar de destaque entre as espécies nativas mais cultivadas no país e maior importância na aquicultura brasileira (Oliveira et al., 2004). Dados mostram que o país vem avançando na produção de peixes e muito deste resultado vem da melhor e mais eficiente produção de peixes redondos, que só no ano de 2018 chegou ao percentual de quase 40% de tudo o que é produzido nacionalmente (Peixe BR, 2019).

Com a criação intensivo da espécie, o animal fica exposto a diversidade de fatores estressantes, que podem levar o animal à imunossupressão e consequentemente, doenças bacterianas e parasitárias (Richards Roberts, 1978). Da mesma forma, o pacu vem enfrentando surtos de mortalidade causados por infecção bacteriana em acultura intensiva (Ferreira et al., 2019). Assim, para o sucesso da criação do pacu, boas práticas de manejo e de medidas que diminuam o efeito negativo de estressores e promovam a higidez dos animais são recomendadas e isso inclui o uso de alternativas alimentares de proteção à saúde dos animais.

2. Objetivos

2.1 Geral

Diante do exposto acima, o estudo se propõe verificar o efeito da inclusão do extrato de *Aloe vera* na alimentação de pacus, através da inclusão de diferentes níveis do extrato da planta por diferentes tempos.

2.2 Específicos

Avaliar o efeito imunomodulador de *Aloe vera* na resposta ao estresse agudo, dos peixes desafiados com *Aeromonas hydrophila*

Estudar as respostas metabólicas sanguíneas e teciduais dos peixes alimentados com *Aloe vera* e desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

Estudar as respostas de estresse dos peixes alimentados com *Aloe vera* e desafiados com *Aeromonas hydrophila*

3. Referências Bibliográficas

- Abdel-Tawwab M., Ahmad, M.H. Seden M.E., Sakr S.F. Use of green tea, *Camellia sinensis* L., in practical diet for growth and protection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), against *Aeromonas hydrophila* infection, *J. World Aquac. Soc.* v.41, p.203 e 213, 2010.
- Abdel-Tawwab M. The use of American ginseng (*Panax quinquefolium*) in practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): growth performance and challenge with *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Aquac.* v.24, p.366–376, 2012.
- Abdel-Tawwab M., Sharafeldin K.M., Mosaad M.N., Ismaiel N.E. Coffee bean in common carp, *Cyprinus carpio* L. diets: effect on growth performance, biochemical status, and resistance to waterborne zinc toxicity, *Aquaculture* v.448, p.207 e 213, 2015.
- Abdy E., Alishahi M., Tollabi M., Ghorbanpour M., Mohammadian T. Comparative effects of *Aloe vera* gel and Freund's adjuvant in vaccination of common carp (*Cyprinus carpio* L.) against *Aeromonas hydrophila*. *Aquac Int* v.25, p.727–742, 2017.
- Abimorad E.G., Carneiro D.J. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles — fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. *Aquaculture Nutrition*. v.13, p.1–9, 2007.
- Abreu J.S., Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com β -glucano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura. Tese de doutorado. Curso de Pós-graduação em Aquicultura. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal, SP, Brasil. 2007
- Adel M., Pourgholam R., Zorriehzahra J., Ghiasi M., Hematological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*, *Fish. Shellfish Immunol.* v.55, p.267 e 273, 2016.
- Ahmad M.H., El Mesallamy A.M.D., Samir F., Zahran F. Effect of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) on growth performance, feed utilization, whole-body composition, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia. *J. Appl. Aquac.* v.23, p.289–298, 2011.
- Ahmad M.H., Abdel-Tawwab M. The use of caraway seed meal as a feed additive in fish diets: growth performance, feed utilization, and whole-body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture* v.314, p.110–114, 2011.
- Ainsworth A.J., A β -glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils, *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.41, p.141-152, 1994.
- Ajlan A., Medicinal plants: a review, *Nat. Prod. Indian J.* 12 (2016).
- Alexander C. P., Kirubakaran C. J. W., Michae R. D. Water soluble fraction of *Tinospora cordifolia* leaves enhanced the non-specific immune mechanisms and disease resistance in *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol.* v.29, p.765–772, 2010.

Alishahi M., Ranjbar M.M., Ghorbanpour M., Peyghan R., Mesbah M. Razijalali M. Effects of dietary *Aloe vera* on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). *International Journal of Veterinary Research* v.4, p.189–195, 2010.

loso J. *Tratados de fitofarmacos y nutraceuticos*. Argentina, Corpus Editorial, 2007.

Adel M., Pourgholam R., Zorriehzahra J., Ghiasi M., HematoeImmunological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*, *Fish. Shellfish Immunol.* v.55, p.267 e 273, 2016.

Aloso J. *Tratados de fitofarmacos y nutraceuticos*. Argentina, Corpus Editorial, 2007.

Aly S. M., Mohamed M. F. *J of Animal Physio and Animal Nutrition*, v.5, n.31-39, 2010.

Aly S.M., Mohamed M. F. *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* v.94, p.31–39, 2010.

Aly, S. M. Mohamed M. F. *Echinacea purpúrea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using nile tilápia (*Oreochormis niloticus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutricion*, v.94, p.31-39, 2010.

Amagase H., Petesch B.L., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components, *Journal Nutrition* v.131, p.955S-62S, 2001.

Anderson D.P., Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture, *Annu. Rev. Fish Dis.* v.2, p.281 e 307, 1992.

Anuário Peixe BR da Piscicultura Brasileira 2019

Asadi M., Mirvaghefi A., Nematollahi M., Banaee M., Ahmadi K. Effects of Watercress (*Nasturtium nasturtium*) extract on selected immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Open veterinary J.* v.2, p.32 e 39, 2012.

Ascaño O. K., Tampos C. R., Tendán J. T., Zausa C., Tumaob K., Teodosio T. B., Regatalio R. Utilization of *Aloe Vera* Extract in Making Paper Glue, A Research Paper, 2010.

Ashraf M. A, Goda S Effect of dietary Ginseng herb (Ginsana_ G115) supplementation on growth, feed utilization, and hematological indices of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fingerlings. *J World Aquac Soc* v.39, n.2, p.205–214, 2008.

Atherton P. *Aloe vera* revisited. *The British Journal of Phytotherapy*, v.4, n.4, p.176-83, 1997.

Atiba A. *Aloe vera* oral administration accelerates acute radiation: delayed wound healing by stimulating transforming growth factor- and fibroblast growth factor production. *The American Journal Of Surgery*, v.201, p.809-818, 2011.

Awaad A.S., Al-Jaber N.A., Antioxidant natural plant, RPMP Ethnomedicine Source & Mech. v.27, p.1 e 35, 2010.

Awad E., Austin B. Use of lupin, *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), J. Fish. Dis. v.33, p.413 e 420, 2010.

Awad E., Austin B. Use of lupin, *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), J. Fish. Dis. v.33, p.413 e 420, 2010.

Awad E., Austin B., Lyndon A.. Effect of dietary supplements on digestive enzymes and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). J Am Sci v.8, 2012.

Balfry S.K., Shariff M., Iwama G.K. Strain differences in non-specific immunity of tilapia *Oreochromis niloticus* following challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Dis. Aquat. Org. v.30, p.77–80, 1997.

Barton B. A., Iwama G. K., Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Review of Fish Diseases, v.1, p.3-26, 1991.

Barton B. A., Stress in finfish: past, present and future a historical perspective. In: G. K. Iwama, A. D. Pickering, J.P. Sumpter, C. B. Schreck, (Eds.). Fish stress and health in aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, New York, NY. p.1-33, 1997.

Bairwa M. K., Jakhar J. K., Reddy A. D.. Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. J. Nat. Prod. Plant Resour. v.2 n.3, p.397-400, 2012.

Bairwa M. K., Jakhar J. K., Satyanarayana Y., Devivaraprasad Reddy A. Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. J. Nat. Prod. Plant Resour., v.2 n.3, p.397-400, 2012.

Bayne C. J., Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish. Developmental and Comparative Immunology, v.25, p.725-43, 2001.

Beaman J. R., Gardner H., Hoffman F., Rosencrance A., Zelikoff J. T. Mammalian immunoassays for predicting the toxicity of malathion in a laboratory fish model. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences, v.56, p.523-542, 1999.

Béné C, Macfadyen G., Allison E. H. Increasing the Contribution of Smallscale Fisheries to Poverty Alleviation and Food Security, Food & Agriculture Org, 2007.

Bernstein R. M., Schluter S. F., Marchalonis J. J. Immunity. In: D. H. Evans, (Ed.). The physiology of fishes. Boca Raton: CRC Press, 2^a ed., p.215-242, 1998.

Beppu H., Shimpo K., Chihara T., Kaneko T., Tamai I., Yamaji S. Antidiabetic effects of dietary administration of *Aloe arborescens* Miller components on multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice: investigation on hypoglycemic action and

systemic absorption dynamics of aloe components. J. Ethnopharmacol. v.103, p. 468–477, 2006. doi: 10.1016/j.jep.2005.10.034

Biller-Takahashi J.D., Takahashi L.S., Saita M. V., Gimbo R. Y., Urbinati E. C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. Braz J Biol v.73, n.2 p.425-429, 2013.

Bilen S., Altunoglu Y.C., Ulu F., Biswas G. Innate immune and growth promoting responses to caper (*Capparis spinosa*) extract in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Fish. Shellfish Immunol. v.57, p.206 e 212, 2016.

Boudreau M. D., Beland F. A. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*. Journal of Environmental Science and Health, v.24, n.1, p.103–154, 2006.

Boyd. Codes of practice for responsible shrimp farming. Global Aquaculture Alliance, St. Louis, MO. Google Scholar, 1999.

Bowden T.J., Cook P., Rombout J.H. Development and function of the thymus in teleosts. Fish & Shelfish Immunology, v.19, p.413-427, 2005.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p.126, 2010.

Brett J. R. Implications of assessment of environmental stress. In The Investigation of Fish-Power Problems. P. A. Larkin, Ed.: 69–83. H. R. MacMillan Lectures in Fisheries. University of British Columbia. Vancouver, Canada, 1958

Bulfon C., Volpatti D., Galeotti M. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. Aquac. Res. v.46, p.513–551, 2015.

Cannon W. B. Organization for physiological homeostasis. Physiological Reviews. v.9, p.399-431, 1929.

Capone D. G., Weston D. P., Miller V., Shoemaker C, Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. Aquaculture v.145, p.5575, 1996. doi: 10.1016/S0044-8486(96)01330-0

Carneiro P.C.F., Urbinati E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. Aquaculture Research, v.32, p.297-304, 2001.

Carvalho J.C.T. Formulário Médico Farmacêutico de Fitoterapia. 2.ed. Editora Pharmabooks, p.404, 2005.

Chakraborty S.B. Hancz C. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture, Rev. Aquac. v.3 p.103 e 119, 2011.

Chang J. Medicinal herbs: drugs or dietary supplements? *Biochem. Pharmacol.* v.59, p.211 e 219, 2000.

Chen J. S. C., Wang T. Y., Tzeng T. D., Wang C. Y., Wang D.. Evidence for a positive selection in the TLR9 gene of teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* v.24, p.234–242, 2008.

Chettri J.K., Kania P.W., Buchmann K. Immunomodulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry by bath exposure to beta-glucan from *Euglena gracilis*. *Aquaculture Research*, v.44, p.1407-1415, 2013.

Chitmanat C., Tongdonmuan K., Khanom P., Pachontis P., Nunsong W., Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a *Terminalia catappa* solution against some tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. III WOCMAP Congress on Medicinal Aromatic Plants-Volume 4: Targeted Screening of Medicinal and Aromatic Plants, Economics v.678, p.179 e 182, 2003.

Chow J. T. N., Williamson D. A., Yates K. M., Goux W. J. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. *Carbohydrate Research*, v.340, p.1131–1142, 2005.

Christybapita D., Divyagnaneswari M., Michael R.D. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology* v.23, p.840-852, 2007.

Christiaki E. V., Florou-Paneri P. C. *Aloe vera*: A plant for many uses. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v.8, n.2, p.245–249, 2010.

Citarasu T., Babu M.M., Sekar R.R.J., Marian M.P. Developing *Artemia* enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*, Fabricius. *Asian Fish. Sci.* v.15, p.21–32, 2002.

Costa O. F. T., Ferreira D. J. S., Mendonça F. L. P, Fernandes M. N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, v.232, p.627-636, 2004.

Cravedi J. P., Choubert G., Delous G. Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture* v.60, p.133–141, 1987. doi: 10.1016/0044-8486(87)90305-X

Cunha A. P., *Farmacognosia e Fotoquímica*. 1. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p.670, 2005.

Dalmo R.A., Ingebrigtsen K., Bogwald J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, v.20, p.241-273, 1997.

Dhabhar, F.S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity - The role of 1060 stress hormones and leukocyte trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.917, p.876-893, 2000.

Direkbusarakom S. Application of medicinal herbs to aquaculture in Asia, Walailak. J Sci Tech v.1, n.1, p.7–14, 2004.

Direkbusarakom S. Application of medicinal herbs to aquaculture in Asia. Walailak J. Sci. Technol. v.1, p.7–14, 2004.

Düğenci S.K., Arda N., Candan A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish, J. Ethnopharmacol. v.88, p.99 e 106, 2003.

Earth Policy Institute: Farmed Fish Production Overtakes Beef, 2013. at http://www.earth-policy.org/plan_b_updates/2013/update114

Eiras J. D. C., Takemoto R. M., Pavanelli G. C. *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes*. Eduem. 2000.

Eng C.T., E. Tech, Introduction and history of cage culture. In: woo, P.T.K.; bruno, D.W.; lim, L.H.S. (Ed). Diseases and disorders of finfish in cage culture. Wallingford. CAB International, 2002. chap. v.1, p. 1 - 40.

Eshun K., He Q. *Aloe vera*: A valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries—A review. Critical Reviews Food Science and Nutrition, v.44, p.91–96, 2004.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2014. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2018. Available at: <http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>

Farahi A., Kasiri M., Sudagar M., Soleimani IM., Zorriehzahra SMJ. Effect of dietary supplementation of *Melisa officinalis* and *Aloe vera* on haematological traits, lipid

oxidation of carcass and performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Online J Anim Feed Res v.1, p.1–5, 2012.

Femenia A., Sanchez E. S., Simal S., Rossello C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate Polymers*, v.39, p.109–117, 1999.

Femenia A., Sanchez E. S., Simal S., Rossello C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate Polymers*, v.39, p.109–117, 2009.

Ferreira M.W., Santos R.M., Silva A.R., Marino E.D., Makimoto S.S., Barbosa G.R.C., Andrade G.B., Mortality in Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) caused by *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas aeruginosa* in Excavated Tank. Acta Scientiae Veter. v.47, p. 379, 2019. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.90826>

Fernandes J.B.K., Carneiro D.J., Sakomura N.K. Crudeprotein sources and levels in diets for pacu fingerlings (*Piaractusmesopotamicus*).Braz. J. Anim. Sci., v.29, p.646–653, 2000.

Fernandes M. O. Estresse social, metabolismo e crescimento em peixes. Dissertação (Mestre em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. p.106, 1997.

Francis G., Harinder P., Makkar S., Becker K. Quillaja saponins—a natural growth promoter for fish. *Anim Feed Sci Technol* v.121, n.1–2, p.147–157, 2005.

Gabriel N.N., Qiang, J. He J., Ma X.Y., Kpundeh M.D., Xu P. Dietary *Aloe vera* supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT), *Fish. Shellfish Immunol.* v. 44, p.504 e 514, 2015.

Galeotti M. Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. *J Appl Ichthyol* v.14, p.189–199, 1998. doi:10.1111/j.1439-0426.1998.tb00641.x

Galina J., Yin G., Ardo L., Jeney Z. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.35, p.669-676, 2009.

Galindo-Villegas J., Hosokawa H. Immunostimulants: towards temporary prevention of diseases in marine fish, *Advances Nutr. Acuicola VII Memorias del VII Simp. Int. Nutr. Acuicola* p.16 e 19, 2004.

Ghehdarijani M.S., Hajimoradloo A., Ghorbani R., Roohi Z., The effects of garlic-supplemented diets on skin mucosal immune responses, stress resistance and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry, *Fish. Shellfish Immunol.* v.49 p.79 e 83, 2016.

Goetz F. W., Iliev D. B., McCauley L. A. R., Liarte C. Q., Tort LB, Planas J. V., MacKenzie S. Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. *Mol Immunol* v.41: p.1199–1210, 2004. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.005

Goel V., Chang C., Slama J. V., Barton R., Bauer R., Gahler R., Basu T. K., Alkylamides of *Echinacea purpurea* stimulate alveolar macrophage function in normal rats. *International Immunopharmacology*, v.2, p.381–387, 2002.

Griffiths S. P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *J. Fish Biol.* v.57, p.1453-1464, 2000.

Grindlay D., Reynolds T. The *Aloe vera* phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Ethnopharmacology*, v.16, p.117-51, 1986.

Guardiola F.A., Porcino C., Cerezuela R., Cuesta A., Faggio C. , Esteban M.A. Impact of date palm fruits extracts and probiotic enriched diet on antioxidant status, innate immune response and immune-related gene expression of European seabass (*Dicentrarchus labra*), *Fish Shellfish Immunol.* v.52, p.298–308, 2016.

Guerra M.F.L. Uso empírico in natura de *Aloe* sp em portadores de conjuntivite. *Revista de Enfermagem da UFPE*, v.2, n.1, p. 36-46, 2008.

- Gunathilaka G.L.B.E., Hur Y., Lim S., Lee K. Effects of dietary supplementation of two types of propolis on growth performance, feed utilization, innate immunity and disease resistance of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, v.18, n.4, p.367-372, 2015.
- Gupta R. Anti-tuberculosis activity of selected medicinal plants against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian Journal of Medical Research*, v.131, p.809-13, 2010.
- Haghighi M, Rohani M.S., Samadi M., Tavoli M., Eslami M, Yusefi R., Study of effects *Aloe vera* extract supplemented feed on hematological and immunological indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research* v.2, p.2143-2154, 2014.
- Hai N. V., The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review, *Aquaculture* v. 446, p.88 e 96, 2015.
- Hajibeglou A., Sudagar M. Immune response of common carp (*Cyprinus caprio*) fed with herbal immunostimulants diets. *Agricultural Journal*, v.5, n.3, p.163-172, 2010.
- Haller J.S. A drug for all seasons Medical and Pharmacological history of Aloe. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, v.66, n.6, p.647-59, 1990.
- Hamman J. H. Composition and Applications of *Aloe vera* Leaf Gel. *Molecules: open access journal [serial on the Internet]*. Aug. 2008 [accessed Dec. 2017]; 13(8): 1599-1616. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/13/8/1599/pdf>
- Harikrishnan R., Kim J.-S., Kim M.-C., Balasundaram C., Heo M.-S. *Prunella vulgaris* enhances the non-specific immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Uronema marinum*, *Aquaculture* v.318 p.61 e 66, 2011.
- Harikrishnan R., Rani M.N., Balasundaram C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection, *Aquaculture* v.221, p.41 e 50, 2003.
- Harikrishnan R., Balasundaram C., Heo M. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*. v.317, p.1–15, 2011.
- Hwang J.-H., Lee S.-W., Rha S.-J., Yoon H.-S., Park E.-S., Han K.-H., Kim S.-J. Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquac. Int.* v.21, p.525–538, 2013.
- Ibidunni A.S, Olubodun O. S., Ikililu A. Growth performance, haematology and histopathology of African catfish (*Clarias gariepinus*) fed varying levels of *Aloe barbadensis* leaves. *J Fish* v.6, p.553–562, 2013.
- Immanuel G., Sivagnanavelmurugan M., Balasubramanian V., Palavesam A. Effect of hot water extracts of brown seaweeds *Sargassum* spp. on growth and resistance to white spot syndrome virus in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquac. Res.* v.41, p.545–553, 2010.

Iwama G., Nakanishi T. (Eds.), The Fish Immune System. Organism, Pathogen and Environment Academic Press, San Diego, p. 103–205, 1997.

Jayathirtha M.G., Mishra S.H. Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiática*. *Phytomedicine* v.11, p.361-365, 2011.

Jobling, M. Fish bioenergetics. Chapman & Hall, London, 1994

Johnson C., Banerji A. Influence of extract isolated from the plant *Sesuvium portulacastrum* on Growth and Metabolism in Freshwater Teleost, *Labeo rohita* (Rohu).

Fishery Tech. v.44, p.229-234, 2007.

Jorgensen E. H., Vijayan M. N., Aluru N., Maule A. G. Fasting modifies Aroclor 1254 impact on plasma cortisol, glucose and lactate responses to a handling disturbance in Arctic charr. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v.132, p.235-245, 2002.

Kemper N., Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecol. Indic. v.8, p.1–13, 2008. doi: 10.1016/j.ecolind.2007.06.002

Kim K.H., Hwang Y.J., Bai S.C. Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*) fed diets containing different doses of aloe, *Aquaculture* v.180 p.13 e 21, 1999.

Krahwinkel D. J., Boothe Junior H. W. Topical and Systemic Medications for Wounds. Vet Clin Small Anim. v.36, p.739-757, 2006

Kumar S., Tiku A. B. Immunomodulatory potential of acemannan (polysaccharide from *Aloe vera*) against radiation induced mortality in Swiss albino mice. Food Agric. Immunol. v.27, p.72–86, 2016.

Kutsepka D. O uso indiscriminado de antibióticos na bovinocultura leiteira uma análise dos riscos para o meio ambiente e a saúde humana. Fórum ambiental da alta paulista, v. 4, p. 1-9, 2009.

L. Christian. Acidifiers in aquaculture prove beneficial. Feed Mix, v.14, p. 11-12, 2006

Logambal S. M., Michael R. D., *Indian J Exp Biol*, v.38, p.1092–1096, 2000.

Ling J. J., Wang Z. G., Cheng H. P., Yu L. M., Liu T. G. Effect of edible film coating on reducing oil uptake in deep-fried fish blocks. Food Science. v.2, p.16, 2011.

Lorenzi H., Matos F. J. A. Plantas medicinais no Brasil – Nativas e exóticas. São Paulo, Instituto Plantarum, 2008.

MacAvoy, R S. E., Zaepfel C. Effects of tricaine methanesulfonate (MS-222) on hematocrit: first field measurements on blacknose dace. Transactions of the American Fisheries Society, v.126: p.500-503, 1997.

Mahdavi M., Hajimoradloo A., Ghorbani R., Effect of *Aloe vera* extract on growth parameters of common carp (*Cyprinus carpio*), *World J. Med. Sci.* v.9, p.55 e 60, 2013.

- Martins M.L., Moraes F. R., Miyazaki D. M., Brum C.D., Onaka E. M., Fenerick J., Bozzo F. R. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatu*s (Monogenea: Dactylogyridae) infection in cultivated pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and its haematological effects. *Parasite*, v.9, p.175-180, 2002
- Mazeaud M. M, Mazeaud F. Adrenergic responses to stress in fish, in: A.D. Pickering (Ed.), *Stress and fish*. Academic Press, London and New York, p.49-76, 1981.
- Meena D.K., Das P., Kumar S., Mandal S.C., Prusty A.K., Singh S.K., Akhtar M.S., Behera B.K., Kumar K., Pal A.K., Mukherjee S.C., Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review), *Fish Physiol. Biochem.* v.3, p.431–457, 2013. Doi: 10.1007/s10695-012-9710-5
- Michael Akam E., David Roberts B., Geoff Richards P. *Drosophila*: the genetics of two major larval proteins. p.215-225, 1978.
- Micol V., Caturla N., Pe´rez-Fons L., Ma´s V., Pérez L., Estepa A. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res* v.66 n.(2–3), p.129–136, 2005.
- Millanao B. A., Barrientos H. M., Gomez C. C., Tomova A., Buschmann A., Dölz H. Injudicious and excessive use of antibiotics: public health and salmon aquaculture in Chile. *Rev. Méd. Chile* v.139, p.107–118, 2011.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013
- Miranda C. D. “Antimicrobial resistance associated with salmonid farming,” in *Antimicrobial Resistance in the Environment*, eds P. L. Keen and M. H. H. M. Montforts (Hoboken, NJ:Wiley-Blackwell), p.423–451, 2012. doi: 10.1002/ 9781118156247.ch22
- Schreck C. B., Tort L. 1 - The concept of stress in fish, in: C.B. Schreck, L. Tort, A.P. Farrell, C.J. Brauner (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, p.1-34, 2016.
- Mohamad S., Abasali H. Effect of plant extracts supplemented diets on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio*), *Res. J. Animal Sci.* v.4 p.26 e 34, 2010.
- Mommsen T. P., Vijayan M. M., Moon T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.9, p.211-268, 1999.
- Mukesh K. B., Jitender K. J., Satyanarayana A., Devivaraprasad, R. Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. *Scholars Research Library, J. Nat. Prod. Plant Resour.*, v.2, n.3, p.397-400, 2012.
- Ndong D., Fall J., The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*), *J. Clin. Immunol. Immunopathol. Res.* v.3, p.1 e 9, 2011.

Nya E.J., Austin B. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *J. Fish. Dis.* v.32 p.963 e 970, 2009.

Nya E. J., Austin B. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *J of Fish Diseases.* v.32, p. 971–977, 2009.

Oba T. E., Mariano S. W., Romagosa L. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: Tavares-Dias, M. (Org.). Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Embrapa Amapá: Macapá, p.226-247. 2009.

Oliveira A. M. B. M. S., Conte L., Possebon J. E., Produção de Characiformes autóctones. In: J. E. P. Cyrino, E. C. Urbinati, D. M. Fracalossi, N. Castagnolli, (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt, p.217-238, 2004.

Oliveira C.A.F., Vetvicka V., Zanuzzo F.S. Beta-glucan successfully stimulated the immune system in different jawed vertebrate species. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.62, n.1290 p.1-6, 2019.

Orsi R. O., Funari S.R.C., Soares A.M.V.C., Calvi S.A., Oliveira S.L. Sforcin J.M., Bankova V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v.6, n.2, p.205-219, 2000.

Ozório R.O.A., Ginneken V. V., Van Den Thillart G., Verstegen M., Verreth J. Dietary carnitine maintains energy reserves and delays fatigue of exercised African catfish fed high fat diets. *Scientia Agricola.* v.62, p.208-213, 2005.

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* v.4, p.33 e 39, 2015.

Penaflores V D Effect of papaya leaf meal on the *Penaeus monodon* post larvae. *Israeli J Aquac Bamidgeh* v.47, n.11, p.25–33, 1995.

Peraza-Gómez V., Luna-González A., Campa-Córdova Á.I., Fierro-Coronado J.A., González O campo H.A., Sainz-Hernández J.C. Dietary microorganism and plant effects on the survival and immune response of *Litopenaeus vannamei* challenged with the white spot syndrome virus. *Aquac. Res.* v.42, p.559–570, 2011.

Pickering A. D. Introduction: The concept of biological stress. In: Pickering A.D. (ed.) *Stress in fish*. Academic Press, London, p. 1–9, 1981.

Pirhonen J., Schreck C. B. Effects of anaesthesia with Ms222, clove oil and CO2 on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout. *Aquaculture*, v.220, p.507-514, 2003.

Pottinger T. G. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler's keepnets. *J. Fish Biol.* v.53, p.728-742, 1998.

Pourmoghim H., Haghighi M., Rohani M.S. Effect of Dietary inclusion of *Origanum vulgare* extract on non-specific immune responses and Hematological Parameters of

Prasad S., Variyur Padhyoy K. B. Chemical investigation of some commonly used spices. *Aryavaidyan*, v.6 n.4 p.262–267, 1993

P.storm. Damaged fish tissue treating method and composition containing *Aloe vera* extract. <http://www.patentstorm.us/patents/4500510/claims.html>. Acessado em 7 de Fevereiro de 2019.

Pugh N., Ross S.A., ElSohly M.A, Pasco D.S. Characterisation of aloeride, a new highmolecular- weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. *J. Agric. Food Chem.* v.49, p.1030-1034, 2001.

Raa J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R (eds) *Advance en Nutricion Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrcion Acouicola*. Merida, Yucatan, p. 47–56, 2000.

Reverter M., Bontemps N., Lecchini D., Banaigs B., Sasal P. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives, *Aquaculture* v.433, p.50 e 61, 2014.

Richardson K., Steffen W., Liverman D. *Climate Change: Global Risks, Challenges and Decisions*, Cambridge University Press, 2011.

Rodnick K. J., Planas J. V. The Stress and Stress Mitigation Effects of Exercise: Cardiovascular, Metabolic, and Skeletal Muscle Adjustments. In *Fish Physiology – Biology of Stress in Fish*, v. 35, 2016.

Rodríguez E. R., Darias J. M., Díaz C. R. *Aloe vera* as a functional ingrediente in foods. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*, v.50, p.305–326, 2010.

Rodríguez-González V.M., Femenia A., González-Laredo R.F., Rocha-Guzmán N.E., Gallegos-Infante J.A., Candelas-Cadillo M.G., Ramírez-Baca P., Simal S., Rosselló C. Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers*, v.86, p.1675–1683, 2011.

Rodriguez-Gonzalez V. M., Femenia A., Gonzalez-Laredo R. F., Rocha-Guzman, Gallegos-Infante N. E. Candelas-Cadillo M. G. Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell-wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers*, n.86, p.1675–2168, 2011.

Sadoul B., Vijayan M. M. Stress and Growth. In *Fish Physiology - Biology of Stress in Fish*, (eds. C. B. Schreck, L. Tort, A. P. Farrell and C. J. Brauner), San Diego, CA: Academic Press. v.35, 2016.

Saint-Paul U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. *Aquaculture*, v.54, p.205–240, 1986.

Sakai M., Current research status of fish immunostimulants, *Aquaculture* v.172, p.63-92, 1999.

Sakai M., Yoshida T., Kobayashi M. Influence of the immunostimulant, EF203, on the immune responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to *Renibacterium salmoninarum*. *Aquaculture*, v.138, p.61-67, 1995.

Santhosha S.G., Prakash Jamuna Prabhavathi S.N. Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: a review. *Food Bioscience*, v.3, n.9, p.59-74, 2013.

Santos E.L., Ludke M.C.M.M., Lima M.R. Extratos vegetais como aditivos em rações para peixes. *Revista Eletrônica Nutritime*, v.6, n.1, p.789-800, 2009.

Sasmal D., Babu C.S., Abraham T.J. Effect of garlic (*Allium sativum*) extract on the growth and disease resistance of *Carassius auratus*. *Indian J Fish.* v.52, p.207-214, 2005.

Saurabh S., Sahoo P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, v.39, p.223-239, 2008.

Secombes C., Wang T. The innate and adaptive immune system of fish, *Infect. Dis. Aquac. Prev. control* v.231, p.3 e 68, 2012.

Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, v.138, p.32, 1936.

Shalaby S.M. Response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fingerlings to diets supplemented with different levels of fenugreek seeds (Hulba). Mansoura University

Journal of Agricultural Science, v.29 n.5, p.2231-2242, 2004.

Shiu Y.-L., Lin H.-L., Chi C.-C., Yeh S.-P., Liu C.-H., Effects of hiram lemon, *Citrus depressa* Hayata, leaf meal in diets on the immune response and disease resistance of juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (bloch), against *Aeromonas hydrophila*, *Fish & Shellfish Immunology* v.55, p.332 e 338, 2016.

Silva N., Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity, *J. Venom. Animals Toxins Incl. Trop. Dis.* v.16, p.402 e 413, 2016.

Sivaram V., Babu M., Immanuel G., Murugadass S., Citarasu T., Marian M., Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections, *Aquaculture* v.237, p.9 e 20, 2004.

Siwicki A.K., Morand M., Klein P., Studnicka M., Terechmajewska E., Modulation of nonspecific defence mechanisms and protection against diseases in fish. *Acta Veterinaria Brno*, v.67, p.323-328, 1998.

Siwicki A.K., Anderson D.P., Dixon O. W., In vitro immunostimulation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. spleen cells with levamisole. *Developmental and Comparative Immunology*, v.14, p.231–237, 1990.

Siwicki A.K., Anderson D. P., Rumsey G. L., Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v.41, p.125- 139, 1994.

Small B. C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*. v.218, p.177-185, 2003.

Small B.C., Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. *Journal of Fish Biology*, v.64, p.589-596, 2004.

Smith V.J., Brown J. H., Hauton C., Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish & Shellfish Immunology*, v.15, p.71-90, 2003.

Solomon A., Golubowicz S., Yablowicz Z., Grossman S., Bergman M., Gottlieb H. E., Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal Agriculture Food Chemistre*. v.20, n.77 p.17-23, 2006.

Stevens, N. *O Poder Curativo da Babosa*, 1999. Disponível em: <<http://www.naturamaonline.com.br/aloe-vera/>>. Acesso em: 14 set. 2017.

Surjushe A., et al. *Aloe vera*: A short review. *Indian Journal of Dermatology*, v.53, n.4, p.163-66, 2008.

Sudhakaran D.S., Sirekha P., Devasree L.D., Premsingh S., Michael R.D. Immunostimulatory effect of *Tinospora cordifolia* Mieres leaf extract in *Oreochromis mossambicus*. *Indian J. Exp. Biol.* v.44, p.726–732, 2006.

Talpur A.D., Ikhwanuddin M., Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch), *Aquaculture* v.364, p.6 e 12, 2012.

Talpur A.D., Ikhwanuddin M., Azadirachta indica (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*, *Fish. Shellfish Immunol.* v.34, p.254 e 264, 2013.

Talpur A.D., *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, (*Lates calcarifer* Bloch) against *Vibrio harveyi* infection, *Aquaculture* v.420, p.71 e 78, 2014.

Tan B.K., Vanitha J., Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review, *Curr. Med. Chem.* v.11, p.1423 e 1430, 2004.

Takei Y., Hwang P. P., Homeostatic Responses to Osmotic Stress. In *Fish Physiology - Biology of Stress in Fish*, v.35, 2016.

Teske M., Trentini, Herbarium A.M.M. – *Compêndio de Fitoterapia*. 3.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico. p.317, 1997.

The Official Publication of the International Aloe Science Council, 2012

Tizard I.R. *Imunologia veterinária: uma introdução*. São Paulo: Roca, 2002.

Todd R Klaenhammer, Martin JKullen. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* Vol 50, Issues v.1 n.2, p.45-57, 1999.

- Torroba M., Zapata A. G. Aging of the vertebrate immune system. *Microscopy Research Technology*, v.62, p.477-481, 2003.
- Tsabang N., Ngah N., Estella F.T., Agbor G. Herbal Medicine and Treatment of Diabetes in Africa: Case Study in Cameroon, *Diabetes Case Reports*, p. 1 e 6, 2016.
- Urbinati E. C., Abreu J. S., Camargo A. C. S., Landinez M.A. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*, v.229, p.389-400, 2004.
- Urbinati E. C., Carneiro P. C. F. Metabolic and hormonal responses of the matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to the stress of transport under the influence of benzocaine. *Journal of Aquaculture in the Tropics*. v.16, n.1, p.75-85, 2001.
- Urbinati E. C., Carneiro P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: J. E. P. Cyrino, E. C. Urbinati, D. M. Fracalossi,; Castagnolli N. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, p.171-194, 2004.
- Urbinati E. C., Zanuzzo F. S., Biller-takahashi J. D. Estresse e sistema imune em peixes. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C (Ed.). *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, p.87-105, 2014.
- Val A.L.; Silva M. N. P.; Val V.M.F.A. Estresse em peixes: ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A.P. (Ed.). *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Livraria Varela, p. 75-88, 2004.
- Vallejos-Vidal E., Reyes-Lopez F., Teles M., MacKenzie S. The response of fish to immunostimulant diets, *Fish. Shellfish Immunol.* v.56, p.34 e 69, 2016.
- Verlhac V., Gabaudan J., The effect of vitamin C on fish health. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland, 1997.
- Vinson J. Effect of *Aloe vera* preparations on the human bioavailability of vitamins C and E. *Phytotherapy*, v.12, n.10, p.760-765, 2005.
- Wedemeyer G. A. Physiology of fish in intensive culture systems. Chapman & Hall, Nova York. 1996.
- Wendelaar Bonga S. E., Hormone Response to Stress. In: A. P. farrel, J.J. cech, J.G. richards, E. D. stevens, (Ed.). *Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment*. Elsevier Academic Press Inc, UK, p.1515-1523, 2011.
- Wendelaar Bonga, S. E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v.77, n.3, p.591-625, 1997.
- WHO, World Health Organization. WHO Monographs on selected medicinal plants, vol. 1. Geneva: WHO Publications. 1999.
- Wood C. M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. *Fish ecophysiology*. London, Chapman & Hall, p.297-321, 1993.

- Wu G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, v.1, n.1, p.31-37, 2010.
- Wurts W. A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. *World Aquaculture*, v.26, p.80-81, 1995.
- Yaron A. Characterisation of *Aloe vera* gel composition and autodegradation and stabilization of the natural fresh gel. *Phytotherapy Research*, v.7, p.11–13, 1993.
- Yin G., Ard L, Thompson K., Adams A., Jeney Z., Jeney G. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*, *Fish. Shellfish Immunol.* v.26, p.140 e 145, 2009.
- Y Ni, Turner, D., Yates, K. M., Tizard, I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *International Immunopharmacology*, v.4, p.1745–1755, 2004.
- Yoshida T., Kruger R., Inglis V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long term oral administration of immunostimulants, *J. Fish. Dis.* v.18, p.195 e 198., 1995
- Yuan C., Li D., Chen W., Sun F., Wu G., Gong Y. Administration of a herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*), *Fish Physiology Biochem.* v.33, p.93 e 101, 2007.
- Zanuzzo F.S., Biller-Takahashi J.D., Urbinati E.C., Effect of *Aloe vera* extract on the improvement of the respiratory activity of leukocytes of matrinxã during the transport stress. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.41, p.2299-2302, 2012.
- Zanuzzo F. S, Zaiden F., Senhorini J. A., Marzocchi- Machado C. M., Urbinati E. C., *Aloe vera* bath improved physical and humoral protection in breeding stock of matrinxã (*Brycon amazonicus*) after induced spawning. *Fish & Shellfish Immunology*, v.45, p.132-140, 2015.
- Zanuzzo F. S., Sabioni R. E., Montoya L. N. F., Favero G., Urbinati E. C. *Aloe vera* enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 65, p. 198-205, 2017.
- Zhou J., Song X.L., Huang J., Wang X. H., Effects of dietary supplementation of A3a-peptidoglycan on innate imune responses and defense activity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, v.251, p.172-181, 2006.

CAPÍTULO 2

Physiological activity of *Aloe vera* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with
Aeromonas hydrophila

Email de submissão do artigo

Re: "Physiological activity of *Aloe vera* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with *Aeromonas hydrophila*"

Full author list: Rudney Weiber Silva Assis; Elisabeth Urbinati, Ph.D

Dear MSc Assis,

We have received the submission entitled: "Physiological activity of *Aloe vera* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with *Aeromonas hydrophila*" for possible publication in Fish Physiology and Biochemistry, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Prof Elisabeth Urbinati who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Fish Physiology and Biochemistry

The screenshot shows the Editorial Manager interface for the journal Fish Physiology and Biochemistry. The user is logged in as Elisabeth Urbinati. The page displays a table of submissions being processed for the author. The table has columns for Action, Manuscript Number, Title, Initial Date Submitted, Status Date, and Current Status. One submission is listed with manuscript number FISH-D-19-00444, titled 'Physiological activity of Aloe vera in pacu (Piaractus mesopotamicus) inoculated with Aeromonas hydrophila', submitted on 19 Nov 2019, with a status date of 01 Jan 2020, and currently 'Under review'. The page also includes navigation links, a main menu, and a footer with the Springer logo.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	FISH-D-19-00444	Physiological activity of Aloe vera in pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) inoculated with <i>Aeromonas hydrophila</i>	19 Nov 2019	01 Jan 2020	Under review

**Physiological activity of *Aloe vera* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated
with *Aeromonas hydrophila***

Rudney Weiber Silva de Assis^a, Elisabeth Criscuolo Urbinati^{a,b,*}

^aUniversidade Estadual Paulista UNESP – Centro de Aquicultura, Campus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane, S/N, Jaboticabal, São Paulo, 14884-900, Brasil

^bUniversidade Estadual Paulista UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane, S/N, Jaboticabal, São Paulo, 14884-900, Brasil

^{a,b,*}elisabeth.criscuolo-urbinati@unesp.br (orcid.org/0000-0001-6623-8095)

*Corresponding author: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane, S/N, Jaboticabal, São Paulo, 14884-900, Brasil.

Acknowledgements We thank the Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) for supplying the fish for the research and the Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos for supplying the bacteria inoculum.

Author contributions All authors contributed to the design of the experiment. The experimental series were conducted by R.W.S.A and supervised by E.C.U. Assays and data analysis were performed by R.W.S.A. with help from E.C.U. The manuscript was written by both authors.

Funding The present research has been granted by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [process number: 142171/2016-6].

ABSTRACT

Aloe vera is a traditional medicinal plant; however, its use in fish is fairly recent. We evaluated the effects of dietary *A. vera* on stress, innate immunity, and energy metabolism in pacu inoculated with *Aeromonas hydrophila*. For 7 days, 192 fish were fed with diets supplemented with 0% (control), 0.5%, 1.0%, and 2.0% of the plant extract, and then inoculated with bacteria and sampled 3, 6, and 24 h later. All concentrations of *A. vera* reduced basal levels of cortisol, and 1.0% reduced cortisol levels more intensely 3 h after inoculation. *A. vera* increased the basal respiratory activity of leukocytes/RAL (0.5 and 1.0%), increased the serum levels of lysozyme (1.0 and 2.0%) 6 h after inoculation, and increased the activity of the complement system after 3 h. Spleen somatic index/SSI increased with 1.0 and 2.0% *A. vera*. *A. vera* also promoted metabolic effects. It increased basal levels of lipids in liver and muscle, as well as hepatosomatic index (1.0%) and, 3 h after inoculation, prevented the reduction of serum triglyceride (1.0%) and reduced the mesenteric fat (1.0%). Bacterial inoculation increased RAL from 3 to 24 h, and lysozyme levels at 24 h, as well as increased serum cholesterol at 24 h and decreased serum triglyceride from 3 to 24 h, regardless of *A. vera*. We concluded that *A. vera* offered for only 7 days had stress reducing effects, stimulated innate immunity, protected triglyceride levels in blood, lipid depots in liver and muscle, and directed the energy mobilization to visceral depots.

Keywords: Herbal extracts; Fish farming; Innate immunity; Stress; Metabolism

Introduction

Aquaculture is increasing worldwide (FAO 2014); however, fish rearing involves many challenges. One of the biggest problems is the outbreak of diseases caused by environmental pathogens and the consequent financial implications for the industry. To control disease outbreaks, several antimicrobial and other drugs have been used indiscriminately. The major concerns with treating fish with antimicrobials are the potential impacts on the aquatic environment and the risks associated with the development of antimicrobial resistance by fish pathogens (WHO 2016; Miranda et al. 2018). Due to the risks involved with the intense use of antibiotics, it is necessary to intensify efforts to develop alternative, and more ecofriendly, treatments.

Immunostimulants are considered an alternative for antibiotics to boost the immunity of fish, thus effectively combating the pathogens.

Recent reviews have emphasized the use of herbs as an emerging approach to enhance the health and immune system of cultured fish, which may have substantial benefits for the aquaculture industry (Galina et al 2009; Citarasu 2010; Harikrishnan et al 2011; Bairwa et al 2012; Vaseeharan and Thaya 2014; Reverter et al 2014; Hai 2015; Bulfon et al 2015; Awad and Awaad 2017; Wang et al 2017). Herb-derived products are a promising source of bioactive molecules, being simultaneously easily available, inexpensive, and more biodegradable in nature compared to synthetic drugs.

Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) is a traditional medicinal plant belonging to the family Aloaceae (WHO 1999) and has been reported to provide numerous benefits to human health, including anticancer, antioxidant, antimicrobial, antiallergic, anti-inflammatory, immunomodulatory, hepatoprotective, antiulcer, and antidiabetic activities (Hamman 2008; Rajeswari et al 2014; Sánchez-Machado et al 2017). Although the use of *A. vera* in aquaculture has increased in recent years (Kim et al 1999; Alishahi et al 2010; Farahi et al 2012; Zanutto et al 2012; Mahdavi et al 2013; Palermo et al 2013; Haghighi et al 2014; Dotta et al 2014; Gabriel et al 2015a, b; Zanutto et al 2015a, b; Zanutto et al 2017; Alishahi et al 2017; Moghaddam et al 2017; Rohani et al 2017; Gabriel et al 2019; Mehrabi et al 2019), the biological properties of this plant that can aid in fish farming have to be clearly defined so that effective new products can be developed. Given the potential benefits of *A. vera* to physiological responses of pacu, our purpose was to evaluate whether feeding fish with diets supplemented with plant extract for 7 days would affect indicators of stress, innate immunity, and metabolism before and after inoculation with heat killed *Aeromonas hydrophila*. Our model fish is commercially valuable in South America and is farmed in aquaculture systems (Valladão et al 2018), and has been affected by outbreaks of mortality caused by bacterial infection under intensive farming (Ferreira et al 2019).

Material and methods

The experimental procedures were approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocol 015618/18), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, Brazil and performed in accordance with the Guidelines of the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Experimental protocol

We utilized 192 juvenile fish (95.5 ± 21.2 g) supplied by the Centro de Aquicultura da UNESP. Fish were randomly distributed into twenty-four 500-liter fiber tanks (eight fish/tank), in a water recirculation system, with continuous aeration and a photoperiod of 12 h light:12 h dark. Fish were acclimated to the experimental conditions for 7 days and fed with commercial feed (28% CP and 3,600 kcal CE/kg) twice a day (9 h 00 and 16 h 00). The feed consumption was registered to determine the amount of experimental diets to be offered. After acclimation, fish were weighed and separated into the following treatment groups: *Aloe vera* free (T1/control – commercial feed CF), T2 – CF + 0.5% *A. vera*, T3 – CF + 1% *A. vera*, T4 – CF + 2% *A. vera*. Each treatment/diet was offered to fish from six tanks (total of 72 fish). Fish were fed twice a day with 3% of fish biomass. During the experimental period, water temperature (27.3 ± 0.4 °C), oxygen levels (7.6 ± 0.3 mg/L) and pH (7.26 ± 0.4) were monitored.

Experimental diets

The experimental diets were prepared using an extruded commercial feed (28% CP and 3,600 kcal CE/kg), ground and mixed with 0.5, 1.0, and 2.0% *A. vera* extract (Nature's Oil with 100% purity, batch 24228) to make the treatments T1, T2, and T3, respectively. The diet was then moistened with 40% water, pelletized in a food processor, and dried at 40 °C for 24 h. The control diet (T1) was processed following the same procedure without the inclusion of *A. vera*.

Preparation of bacteria

The *A. hydrophila* strain, supplied by the Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LAPOA/CAUNESP), was isolated from pacu and had been previously identified by gene sequencing (16S rDNA) (Genbank identification as KJ561014) (Sebastião et al 2015). The strain was stored in TSB culture medium (Tryptic Soy Broth, HMedia) at -80 °C, and, before inoculation, a 20 µl aliquot was re-suspended in 5 ml of TSB solution, autoclaved, and incubated at 28 °C for 24 h. The pre-inoculum was added to 700 ml of TSB medium, autoclaved, and incubated again at 30 °C for an

additional 24 h. The bacterial suspension was centrifuged at 8.000 x g for 30 min, and the supernatant was discarded. The pellets were then washed twice in PBS (0.01 M) and the suspension was centrifuged again. This operation was repeated three times. The bacteria were diluted at 10⁸ CFU/ml for spectrophotometer reading and inactivated at 40 °C for 30 min.

Samplings and analysis

After 7 days feeding with the experimental diets, fish were sampled (basal sampling). After sampling, the remaining fish were intraperitoneally inoculated with the heat-killed *A. hydrophila* and sampled 3, 6, and 24 h later. In each sampling, 12 fish from each treatment (two per tank) were anesthetized (benzocaine, 0.05 g/L), weighed, and blood samples were drawn from caudal vessels and dispensed into 2-ml microtubes with or without anticoagulant to separate plasma and serum, respectively. After blood collection, fish were euthanized with an overdose of benzocaine (0.1 g/L), opened ventrally, and liver, spleen, and visceral fat were removed and weighed to determine the somatic indexes [(organ weight/body weight) x 100]. Samples of liver and muscle were frozen and kept at -20 °C for further determination of glycogen and lipid levels in liver and lipid levels in muscle.

Stress indicators

Plasma cortisol levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay with a commercial kit (DRG® Cortisol ELISA, EIA-1887; DRG International, Inc., EUA). Plasma glucose levels were measured by an enzymatic method with a commercial kit (Labtest, São Paulo, Brazil, code 133).

Innate immune indicators

The respiratory activity of leukocytes was determined through the production of reactive oxygen species (ROS), measured by the reduction of NBT (Nitroblue tetrazolium chloride – Sigma Aldrich, N6876), following the protocol described by Anderson and Siwicki (1995) and modified for pacu blood by Biller-Takahashi et al (2013).

Immediately after collection, 50 µL of heparinized blood was incubated with an equal volume of NBT solution (0.2%) at room temperature for 30 min. Thereafter, 1 mL of DMF (dimethylformamide, Sigma Aldrich, 227056) was added to the samples, which were read in a spectrophotometer (Thermo Scientific®, Genesys 10S) at 540 nm.

The hemolytic activity of the alternative pathway (HAC_{50}) of complement was measured in serum according to Ferriani et al (1990) and Polhill et al (1978) and modified for pacu blood by Zanuzzo et al (2017). A kinetic assay determined the time (sec) necessary for 100 µl of a serum sample to lyse 50% of 400 µl of a rabbit erythrocyte suspension in Alséver solution (anticoagulant, pH 6.1), measured in a spectrophotometer (Thermo Scientific®, Genesys 10S), with readings every 30 seconds for 20 min at 700 nm.

The lysozyme levels were determined according to Demers and Bayne (1997) with modifications by Zanuzzo et al (2014a), based on lysis of the gram-positive bacterium *Micrococcus lysodeikticus* suspension (Sigma Aldrich, M3770), using hen egg white lysozyme as a standard (Sigma Aldrich, L6876). Standard solutions of hen egg white lysozyme (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil; L6876) and serum samples were placed into 96-well plates in triplicate with a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil; M3770). After mixing, the change in absorbance over 10 min was measured at 450 nm using a microplate reader (Benchmark, BIORAD, USA) at room temperature. The rate of decrease in absorbance (ΔOD) of serum samples was then compared to that obtained with the standard curve (ng/µl).

Metabolic indicators

Serum triglycerides and cholesterol levels were measured with commercial kits (Labtest, São Paulo, Brazil, codes 87 and 76, respectively).

Liver glycogen levels were determined according to Perry et al (1988), and lipid levels in liver and muscle were measured following the extraction protocol by Folch et al (1957), adapted by Parrish (1999) and determination according to Frings et al (1972).

Statistical analysis

The experiment was set up with a completely randomized design with a factorial arrangement of four treatments (control, 0.5, 1.0, and 2.0% *A. vera*) vs. four time points (basal and 3, 6, and 24 h after inoculation). All data were submitted to normality (Cramer-von Mises) and homoscedasticity (Brown-Forsythe) and, if they failed, they were transformed prior to statistical analysis. To adjust cortisol and glucose levels data for normality, data were transformed using log₁₀ (cortisol), and SQRT (glucose). In addition, the experiment was analyzed as a two-way ANOVA followed by Duncan's new multiple range test. The level of statistical significance in all analyses was $p < 0.05$. Values in the figures are means $\pm$ SE.

Results

We fed juvenile fish with a diet supplemented with *Aloe vera* extract for 7 days and then inoculated fish with inactivated *A. hydrophila*. We measured blood cortisol and glucose levels, the respiratory activity of leukocytes, lysozyme levels, activity of the complement system (alternative pathway) in serum, blood triglyceride and cholesterol levels, and lipids levels in liver and muscle. There was no mortality during the experimental period.

Stress indicators

All concentrations of *A. vera* reduced basal levels of cortisol in fish fed for 7 days ($p < 0.05$) (Fig. 1 A). At 3 h after inoculation with *A. hydrophila*, fish fed with 1.0% *A. vera* presented the lowest cortisol values, followed by fish that received 2.0% ($p < 0.05$). We did not observe differences in plasma cortisol levels over time in fish fed with *A. vera* ($p > 0.05$), except in the control group (Aloe free), in which values reduced 6 h after inoculation and remained stable up to the 24 h sampling time ($p < 0.05$). Neither *A. vera* nor the inoculum affected blood glucose levels ($p > 0.05$) (Fig. 1 B).

Innate immune indicators

A. vera affected RAL after 7 days of feeding ($p < 0.05$) (Fig. 2 A). Fish fed with 0.5 and 1.0% *A. vera* showed higher basal levels of RAL compared to control fish. Bacterial inoculum increased RAL in fish from all treatments ($p < 0.05$) at 3 to 24 h. Six hours after

inoculation, we observed an increase in serum lysozyme levels ($p < 0.05$) (Fig. 2 B) in fish fed with 1.0 and 2.0% *A. vera*, and, at 24 h, an increase was observed in fish from all treatments including controls. HAC_{50} was enhanced in fish fed with 1% *A. vera* after bacterial inoculation ($p < 0.05$) at 3 to 24 h (Fig. 2 C).

Metabolic indicators in blood and tissues

A. vera did not affect serum cholesterol levels over time ($p > 0.05$); however, we observed an increase in fish from all groups 24 h after bacterial inoculation (Fig. 3 A). The extract did not affect basal levels of triglycerides (Fig. 3 B) ($p > 0.05$); however, it prevented the reduction of levels in fish fed with 1.0% *A. vera* 3 and 6 h after inoculation ($p < 0.05$). In all other fish groups, we observed a reduction in triglyceride levels at 3 to 24 h after inoculation.

The effect of *A. vera* on tissue metabolites was evaluated only at basal sampling. The 7-day feeding with 1.0% *A. vera* increased the total lipid levels in liver and muscle ($p < 0.05$) (Fig. 4 A and B), whereas no effect was observed in liver glycogen levels ($p > 0.05$), which varied from 3.91 ± 1.09 % to 4.83 ± 0.85 %.

Somatic indexes

A. vera increased SSI in fish fed with 0.5 and 1.0% of the extract and decreased the MFI in those fed with 1.0% 3 h after bacterial inoculation ($p < 0.05$) (Fig. 5 A and B, respectively). The inoculum did not affect the HSI, but the 7-day feeding (basal sampling) with 1.0% increased the values, coinciding with higher values of liver lipid ($p < 0.05$) (Fig. 5 C).

Discussion

Environmentally safe strategies for enhancing fish health and treating fish disease, such as using herbal and natural products, are newly emerging approaches and alternative strategies that may have substantial benefits for the aquaculture industry (Lieke et al 2019). *Aloe vera* is a highly efficacious plant used worldwide for its health and medicinal properties. To assess the physiological effects of *A. vera* extract in fish, we fed juvenile pacu with diets supplemented with the plant extract for 7 days, and inoculated fish with inactivated *A. hydrophila*. We then measured various indicators of stress, innate immunity, and energy metabolism and, interestingly, found effects in all indicators.

We measured cortisol levels because immune mechanisms are regulated by hormones, mainly cortisol, secreted during the stress response (Yada and Tort 2016). *A. vera* reduced the basal levels of cortisol, and this reduction intensified in fish fed with 1.0% of the herbal extract 3 h after bacterial inoculation. This is the first study showing *A. vera* to have such a strong modulating effect on the dynamics of circulating cortisol. Very little is known about the effects of this plant as modulator of cortisol secretion; although, in a previous study (Zanuzzo et al 2017) in which pacu were fed the extract for 10 days, the authors found *A. vera* increased cortisol levels 24 h after transport and prevented high cortisol levels after inoculation with heat-killed *A. hydrophila*; however, the authors did not explain the mechanisms behind the results. Similarly, we also do not have an explanation for our results, but we believe that *A. vera* has a protective response. It is difficult to explain the general effects of *A. vera*. In fact, more than 200 bioactive compounds have been found in its gel (Ahlawat and Khatkar 2011). The biological activities of aloe leaf extracts are most likely due to the synergistic action of several compounds rather than just one (Hamman 2008). Our data add evidence that *A. vera* may modulate cortisol levels in fish.

A. vera stimulated the responses of the three immune indicators measured in pacu, before and after bacterial inoculation of fish. We found an increase in the basal respiratory activity of leukocytes, an increase in serum levels of lysozyme (6 h) preceding the general increase observed in all other treatments (24 h), and activation of the complement system (at 3, 6, and 24 h). These responses were reflected in an increased spleen size in treated fish.

Oxidative burst is a component of the innate immune system that facilitates the destruction of pathogens by production of reactive oxygen species/ROS by activated leukocytes (Havixbeck and Barreda 2015; Nguyen et al 2017). Our results show there was an activation of ROS production before the injection of the inactivated bacteria. Reinforcing our data, Mehrabi et al (2019), feeding rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with dietary *A. vera*, also found increased respiratory burst activity in comparison with controls. However, in contrast to our study, the authors fed the fish with 15 g/kg of extract for 8 weeks. Im et al (2005) isolated polysaccharides from the gel of *A. vera* and found that molecules between 400 and 5 kDa (kilodaltons) exhibited the most potent macrophage-activating activity, as determined by increased cytokine production, nitric oxide release, expression of surface molecules, and phagocytic activity. Previously, Zanuzzo et al (2017), using a different experimental protocol, found that *A. vera* seemed

to trigger a protective effect on phagocytic activity in fish. The authors found a decrease in ROS production after transport in control fish, but they did not find a decrease in fish fed with *A. vera*. Other studies have also shown a reduction in LRB promoted by the stress caused by transport (Zanuzzo et al 2017) and by induced spawning (Zanuzzo et al 2015b).

Lysozyme is an endogenous antibacterial agent that protects against microbial invasion by digesting cell wall components, thus causing lysis of both Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria. In addition, it activates the complement system and phagocytes and has an opsonic effect (Saurabh and Sahoo 2008). In our study, bacterial inoculation increased lysozyme concentrations within 24 h in control fish; however, interestingly, fish fed with 1 and 2% *A. vera* showed an early response at 6 h, suggesting anticipation of the immune protection. Other studies which showed stimulation of lysozymes by *A. vera* used different experimental protocols. Mehrabi et al (2019) found higher levels of lysozymes in rainbow trout when they were fed the extract; however, much higher concentrations (5, 10, and 15 g/kg) were used and for longer (8 weeks of feeding). Moghaddam et al (2017) described the stimulating effect of *A. vera* (1.5%) on lysozyme levels in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*); however, the fish were fed the extract for 60 days. In both studies, the immune systems were not challenged with bacterial inoculation. *A. vera* also improved lysozyme responses in pacu fed with the extract when fish were previously subjected to transport (Zanuzzo et al 2017).

The complement system is considered an important indicator of fish immune competence, as it plays an essential role in detecting pathogens in addition to mediating the opsonization of pathogens and facilitating their recognition by phagocytes (Boshra and Sunyer 2006). In pacu, activation of the complement system was evident 3 h after the bacterial inoculation of fish fed 1% *A. vera*, confirming the immunostimulatory properties of the plant and suggesting it enhances resistance against bacterial infection. This response was activated earlier than the lysozyme response (6 h). Complement system proteins disrupt bacterial membranes, facilitating the action of antimicrobial enzymes, such as lysozymes (Boshra and Sunyer 2006). The activating effects of *A. vera* in proteins of complement system, as in RAL leukocytes and lysozyme responses, were described in the publications mentioned above (Zanuzzo et al 2017; Moghaddam et al 2017; Mehrabi et al 2019), but these studies used experimental conditions not comparable to those from our study.

The stimulating effects on the immune response that we observed, either through antigenic stimulation of *A. hydrophila* or by *A. vera*, were reflected in an increased spleen size in fish fed with the herbal extract after bacterial inoculation. The spleen serves as one of the primary hemopoietic organs in teleost (Agius and Roberts 2003). In the spleen of fish, white pulp proliferation, lymphocyte depletion, and an increase in spleen size, among other changes, have been used as indicators of immune response associated with environmental contamination (Gogal et al 1999; Garcia-Abiado et al 2004).

In addition to our findings on the stress reducing and immunomodulator roles of *A. vera* in pacu in this study, we also uncovered interesting effects involving metabolic responses. We found *A. vera* had a protective effect on some lipid reserves. The extract prevented the mobilization of blood triglycerides 3 and 6 h after bacterial inoculation, and increased the basal levels of lipids in liver and muscle. Conversely, the plant extract mobilized visceral lipid 3 h after inoculation. The observed activation of the immune system is an energetically expensive process, and the reduction of blood triglycerides indicates this reserve was used to meet the demand of the immune response, except in fish fed with 1% *A. vera*, in which the source of energy was the visceral depots. Lipids are an important source of energy. The main lipid deposits in fish are located in adipose tissue, muscle, and liver (Sheridan 1994). Mesenteric fat is the primary lipid depot and is well-suited for long-term storage, and most likely possesses unlimited storage capacity after the differentiation of preadipocytes to adipocytes. Lipid storage in liver and muscle is secondary and is probably more influenced by life history patterns than mesenteric fat (Sheridan 1994).

Scarce data are available on the role of *A. vera* on energy metabolism, and most of our knowledge is related to metabolic disorders (Rajasekaran et al 2006; Choudhary et al 2014; Alinejad-Mofrad et al 2015; Pothuraju et al 2016). According to these studies, *A. vera* lowers blood glucose levels in diabetic patients and improves the responsiveness of the body's tissues towards insulin. Additionally, it helps lower serum cholesterol and triglycerides and increases high-density lipoprotein cholesterol levels. In juvenile goldfish (*Carassius auratus*), a 2% aloe powder dietary supplement reduced blood cholesterol following 30 days of exposure (Palermo et al 2013). In another study, when GIFT-tilapia (*Oreochromis niloticus*) was fed 4% dietary aloe, a reduction in total cholesterol was seen, while those fed 0.5, 2, and 4% aloe showed a reduction in triacylglycerol. In contrast to both studies (Palermo et al 2013; Gabriel et al 2015a), we

did not find changes to the basal levels of blood cholesterol levels and triglycerides after feeding fish *Aloe vera* for 7 days.

Conclusions

Based on our data, this study suggests that *Aloe vera*, mainly as a 1% extract, can be used as a fish feed supplement to reduce stress response and improve innate immunity. In addition, *A. vera* modulates the dynamics of lipid reserves, directing the energy mobilization to visceral depots. The use of *A. vera* in aquaculture is promising; however, the scarcity of data indicates that further studies focusing on the effective use of *A. vera* as a feed supplement are needed. The immunomodulator effect of the herbal extract seems clear; however, new experimental protocols will have to be developed, and biochemical details of its action on physiological functions must be systematically investigated.

References

- Agius C, Roberts RJ (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. J. Fish Dis 26:499-509
- Ahlawat KS, Khatkar BS (2011) Processing, food applications and safety of *aloe vera* products: A review. J Food Sci Technol 48:525-533
- Alinejad-Mofrad S, Foadoddini M, Saadatjoo SA, Shayesteh M (2015) Improvement of glucose and lipid profile status with *Aloe vera* in pre-diabetic subjects: a randomized controlled-trial. J Diab Met Dis 14:22
- Alishahi M, Ranjbar MM, Ghorbanpour M, Peyghan R, Mesbah M, Razijalali M (2010) Effects of dietary *Aloe vera* on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). Int J Vet Res 4 189-195.
- Alishahi M, Dezfuly ZT, Mohammadian T, Mesbah M (2017) Effects of *Aloe Vera* crude extract on growth performance and some hemato-immunological indices of *Oncorhynchus mykiss* in farm scale. Iranian J Vet Med 10:383-394
- Anderson DP, Siwicki AK (1995) Basic haematology and serology for fish health programs, Diseases in Asian Aquaculture II, Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society 185-202
- Awad E, Awaad (2017) A Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. Fish Shellfish Immunol 67:40-54

- Baltzegar DA, Reading BJ, Douros JD, Borski RJ (2014) Role for leptin in promoting glucose mobilization during acute hyperosmotic stress in teleost fishes. *J Endocrinol* 220:61–72
- Bairwa MK, Jakhar J, Reddy AD (2012) Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. *J Nat Prod Plant Resour* 2:397–400
- Biller-Takahashi JD, Takahashi LS, Saita MV, Gimbo RY, Urbinati EC (2013) Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Braz J Biol* 73:425–429
- Boshra H, Li J, Sunyer JO (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 20:239–262
- Bulfon C, Volpatti D, Galeotti M (2015) Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquacul Res* 46:513–551
- Choudhary M, Kochhar A, Sangha J (2014) Hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Aloe vera* L. in non-insulin dependent diabetics. *J Food Sci Technol* 51:90–96
- Citarasu G (2010) Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquacult Int* 18:403–414
- Demers NE, Bayne CJ (1997) The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev Comp Immunol* 21:363–373
- Dotta G, Andrade JIA, Gonçalves ILT, Brum A, Mattos JJ, Maraschin M, Martins ML (2014) Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and *Aloe barbadensis*. *Fish Shellfish Immunol* 39:280–284
- FAO (2014) The State of World Fisheries and Aquaculture. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>
- Farahi A, Kasiri M, Sudagar M, Soleimani IM, Zorriehzahra SMJ (2012) Effect of dietary supplementation of *Melisa officinalis* and *Aloe vera* on haematological traits, lipid oxidation of carcass and performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Online *J Anim Feed Res* 1:1–5
- Ferreira MW, Santos RM, Silva AR, Marino ED, Makimoto SS, Barbosa GRC, Andrade GB (2019) Mortality in Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) caused by *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas aeruginosa* in Excavated Tank. *Acta Scientiae Veter.* 47:379

- Ferriani VPL, Barbosa JE, Carvalho IF (1990) Serum hemolytic classical and alternative pathways of complement in infancy - age-related-changes. *Acta Paediatr Scand* 79:322–327
- Folch J, Less M, Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-503
- Frings CS, Fendly TW, Dunn RT, Quenn CA (1972) Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clin Chem* 18:673-674
- Gabriel NN, Qiang J, Ma XY, He J, Xu P, Liu K (2015a) Dietary *Aloe vera* improves plasma lipid profile, antioxidant, and hepatoprotective enzyme activities in GIFT-tilapia (*Oreochromis niloticus*) after *Streptococcus iniae* challenge. *Fish Physiol Biochem* 41:1321–1332
- Gabriel NN, Qiang J, He J, Ma XY, Kpundeh MD, Xu P (2015b) Dietary *Aloe vera* supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). *Fish Shellfish Immunol* 44: 504-514
- Gabriel NN, Wilhelm MR, Habte-Tsion H-M, Chimwamurombe P, Omoregie E, Iipinge LN, Shimooshili K (2019) Effect of dietary *Aloe vera* polysaccharides supplementation on growth performance, feed utilization, hemato-biochemical parameters, and survival at low pH in African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings. *Int Aquat Res* 11:57–72
- Galina J, Yin G, Ardó L, Jeney Z (2009) The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiol Biochem* 35:669–676
- Garcia-Abiado MA, Mbahinzireki G, Rinchard J, Lee KJ, Dabrowski K (2004) Effect of diets containing gossypol on blood parameters and spleen structure in tilapia, *Oreochromis* sp., reared in a recirculating system. *J Fish Dis* 27:359-368
- Gogal RM, Smith BJ, Robertson JL, Smith SA, Holladay SD (1999) Tilapia (*Oreochromis niloticus*) dosed with azathioprine display immune effects similar to those seen in mammals, including apoptosis. *Vet Immunol Immunopathol* 68:209-227
- Haghighi M, Rohani MS, Samadi M, Tavoli M, Eslami M, Yusefi R (2014) Study of effects *Aloe vera* extract supplemented feed on hematological and immunological indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int J Adv Biol Biomed Res* 2:2143-2154.
- Hai NV (2015) The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture* 446:88–96

- Hamman JH (2008) Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. *Molecules* 13:1599–1616
- Rajeswari R, Umadevi M, Rahale CS, Pushpa R, Selvavenkadesh S, Kumar KPS, Bhowmik D (2014) *Aloe vera*: The Miracle Plant Its Medicinal and Traditional Uses in India. *J Pharmacogn Phytochem* 1:118-124
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo M-S (2011) Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317:1–15
- Havixbeck JJ, Barreda DR (2015) Neutrophil development, migration, and function in teleost fish. *Biology* 4:715-734
- Im SA, Oh ST, Song S, Kim MR, Kim DS, Woo SS, Jo TH, Park YI, Lee CK (2005) Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *Int Immunopharmacol* 5:271-279
- Kim KH, Hwang YJ, Bai SC (1999) Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish *Sebastes schlegeli* / fed diets containing different doses of aloe. *Aquaculture* 180:13–21
- Lieke T, Meinelt T, Hoseinifar SH, Pan B, Straus DL, Steinberg CEW (2019) Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Rev Aquac* 1–23
- Mahdavi M, Hajimoradloo A, Ghorbani R (2013) Effect of *Aloe vera* Extract on Growth Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio*). *World J Medical Sci* 9:55-60
- Mehrabi Z, Firouzbakhsh F, Rahimi-Mianji G, Paknejad H (2019) Immunostimulatory effect of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) on non-specific immune response, immune gene expression, and experimental challenge with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 503: 330–338
- Miranda CD, Godoy FA, Lee MR (2018) Current Status of the Use of Antibiotics and the Antimicrobial Resistance in the Chilean Salmon Farms. *Front Microbiol* 9:1284
- Moghaddam SB, Haghighi M, Rohani MS, Hamidi M, Ghasemi M (2017) The effects of different levels of *Aloe vera* extract on some of the hematological and non-specific immune parameters in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), *Iranian J Fish. Sci* 16:1234-1247
- Nguyen GT, Green ER, Mecas J (2017) Neutrophils to the ROScues: mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7:373

- Palermo FA, Cocci P, Angeletti M, Felici A, Polzonetti-Magni AM, Mosconi G (2013) Dietary *Aloe vera* components' effects on cholesterol lowering and estrogenic responses in juvenile goldfish, *Carassius auratus*. *Fish Physiol Biochem* 39:851–861
- Parrish CC (1999) Determination of Total Lipid, Lipid Classes, and Fatty Acids in Aquatic Samples, in *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer, New York, pp.4-20
- Perry SF, Walsh PJ, Mommsen TP, Moon TW (1988) Metabolic consequences of hypercapnia in the rainbow trout *Salmo gairdneri*: β -adrenergic effects. *Gen Comp Endocrinol* 69:439-447
- Polhill RB, Pruitt KM, Johnston RB (1978) Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system, 1. Experimental and mathematical analyses. *J Immunol* 121:363–370
- Pothuraju R, Sharma RK, Onteru SK, Shaik SS, Hussain A (2016) Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of *Aloe vera* Extract Preparations: A Review. *Phytother Res* 30:200–207
- Rajasekaran R, Ravi K, Sivagnanam K, Subramanian S (2006) Beneficial effects of aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33:232–237
- Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P (2014) Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433:50–61
- Rohani MS, Haghighi M, Moghaddam SB (2017) Study on nanoparticles of *Aloe vera* extract on growth performance, survival rate and body composition in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), *Iranian J Fish. Sci* 16:457-468
- Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, Sendón R, Sanches-Silva A (2017) *Aloe vera*: Ancient knowledge with new frontiers. *Trends in Food Science and Technology* 61:94-102
- Saurabh S, Sahoo PK (2008) Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquacult Res* 39:223-239
- Sebastião FA, Furlan LR, Hashimoto DT, Pilarski F (2015) Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. *Adv Microbiol* 5:409-424
- Sheridan MA (1994) Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *J Comp Biochem Physiol B* 107:495-508

- Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F (2016) South American fish for continental aquaculture. *Rev Aquac* 10:351–369
- WHO, World Health Organization (1999) WHO Monographs on selected medicinal plants, vol. 1. Geneva: WHO Publications.
- Vaseeharan B, Thaya R (2014) Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquacult Int* 22: 1079–1091
- WHO World Health Organization (2016) Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals Intended for Food: Report of a WHO Consultation with the Participation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the Office International des Epizooties. Geneva: World Health Organization; Available at: <http://www.who.int/foodsafety/publications/containment-amr/en/> (accessed 13 Sep 2019).
- Wang W, Sun J, Liu C, Xue Z (2017) Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquacult Res* 48:1–23
- Yada T, Tort L (2016) Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions, *Fish Physiology - Biology of Stress in Fish*. 35:365–403
- Zanuzzo FS, Biller-Takahashi JD, Urbinati EC (2012) *Aloe vera* improves the respiratory activity of leukocytes of matrinxã (*Brycon amazonicus*) during the transport stress. *Rev Bras Zootec* 41:2299-2302
- Zanuzzo FS, Urbinati EC, Rise ML, Hall JR, Nash GW, Gamperl AK (2015a) *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in *Aloe vera* fed steelhead trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture* 435:1–9
- Zanuzzo FS, Zaiden SF, Senhorini JA, Marzocchi-Machado CM, Urbinati EC (2015b) *Aloe vera* bath improved physical and humoral protection in breeding stock of matrinxã (*Brycon amazonicus*) after induced spawning. *Fish Shellfish Immunol* 45:132-140
- Zanuzzo FS, Sabioni RE, Montoya LNF, Favero G, Urbinati EC (2017) *Aloe vera* enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol* 65:198–205

Figure 1

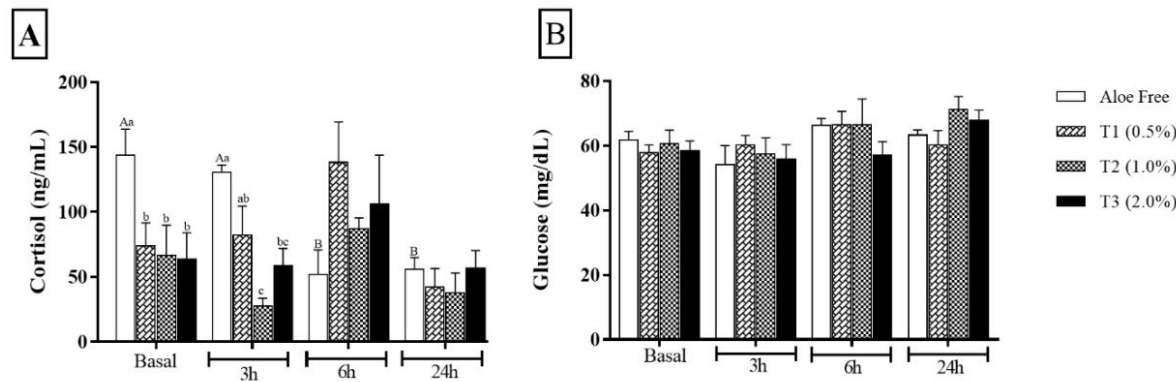


Figure 2

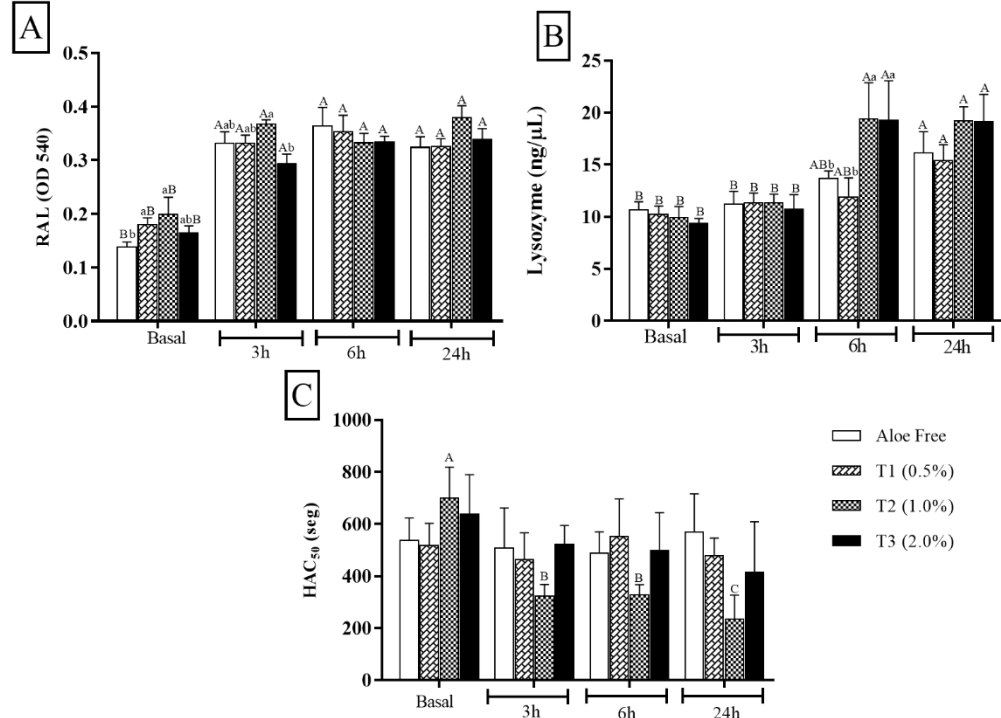


Figure 3

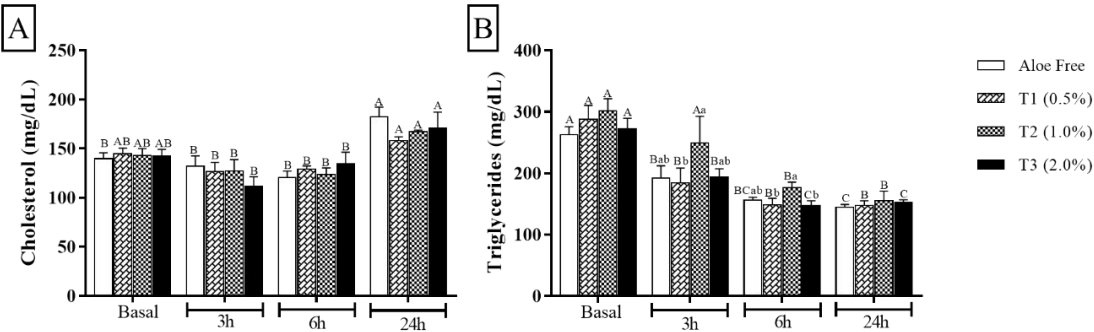


Figure 4

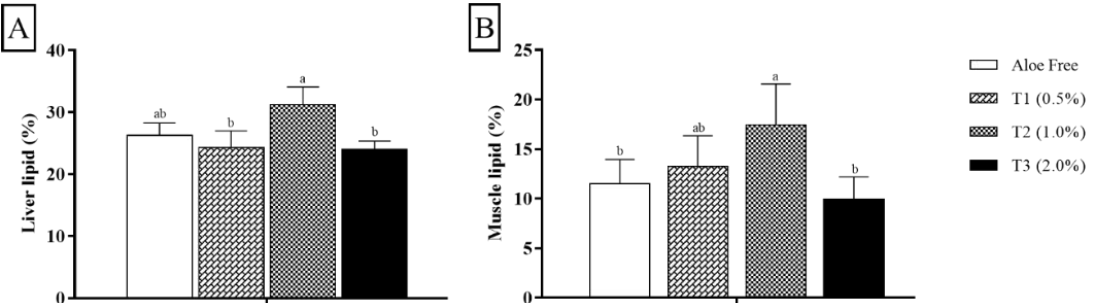


Figure 5

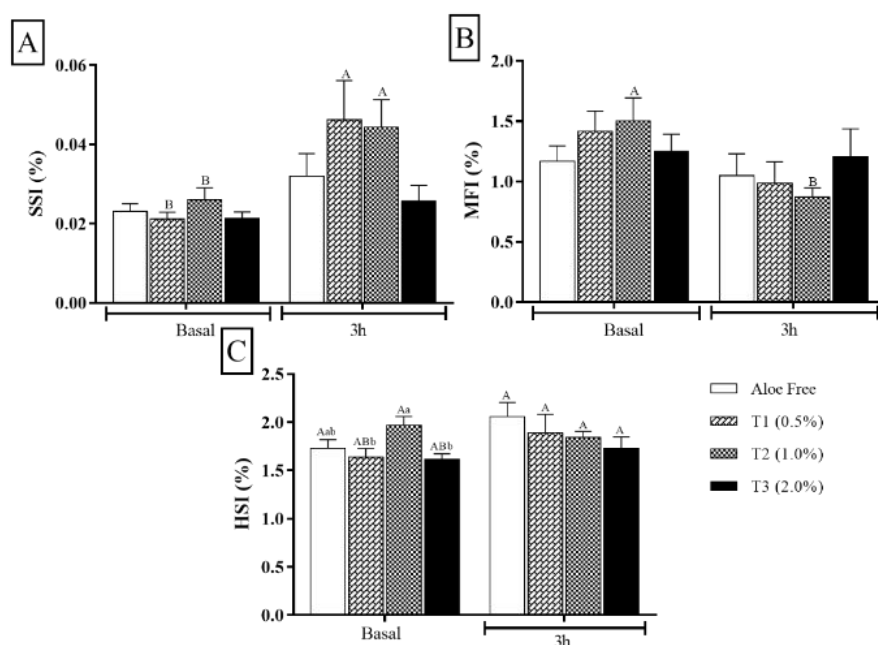


Fig. 1 Plasma cortisol (A) and glucose (B) levels of pacu fed for 7 days with diets supplemented with *Aloe vera*, before (basal) and 3, 6, and 24 hours after inoculation with inactivated *Aeromonas hydrophila*. Lower case letters indicate differences between treatments in the same sampling. Capital letters indicate differences in each treatment between sampling times. Absence of letters indicates a lack of difference

Fig. 2 Respiratory activity of leukocytes (A), serum lysozyme levels (B), and serum activity of the complement system (alternative pathway) (AHC₅₀) (C) of pacu fed for 7 days with diets supplemented with *Aloe vera*, before (basal) and 3, 6, and 24 hours after inoculation with inactivated *Aeromonas hydrophila*. Lower case letters indicate differences between treatments in the same sampling. Capital letters indicate differences in each treatment between sampling times. Absence of letters indicates a lack of difference

Fig. 3 Serum cholesterol (A) and triglyceride (B) levels of pacu fed for 7 days with diets supplemented with *Aloe vera*, before (basal) after inoculation with inactivated *Aeromonas hydrophila*. Lower case letters indicate differences between treatments in the same

sampling. Capital letters indicate differences in each treatment between sampling times. Absence of letters indicates a lack of difference

Fig. 4 Total lipid concentrations in liver (A) and muscle (B) of pacu fed for 7 days with diets supplemented with *Aloe vera*. Lower case letters indicate differences between treatments in the same sampling. Capital letters indicate differences in each treatment between sampling times. Absence of letters indicates a lack of difference

Fig. 5 Spleen somatic index (A), mesenteric fat index (B), and hepatosomatic index (C) of pacu fed for 7 days with diets supplemented with *Aloe vera* before (basal) and 3 hours after inoculation with inactivated *Aeromonas hydrophila*. Lower case letters indicate differences between treatments in the same sampling. Capital letters indicate differences in each treatment between sampling times. Absence of letters indicates a lack of difference

CAPÍTULO 3

Avaliação da atividade imunológica, metabólica e de estresse de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com *Aloe vera* e desafiados com *Aeromonas hydrophila*

Avaliação da atividade imunológica, metabólica e de estresse de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com *Aloe vera* e desafiados com *Aeromona hydrophila*

Resumo

A *Aloe vera* é uma planta medicinal tradicional; no entanto, seu uso em peixes é bastante recente. Avaliamos os efeitos do extrato da como suplemento da dieta de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) sobre respostas de estresse, imunidade inata e metabolismo energético em peixes inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Durante 15 dias, 240 peixes foram alimentados com dietas suplementadas com 0% (controle), 0,5%, 1,0% e 2,0% do extrato da planta, e depois inoculados com bactéria inativada e amostrados 3, 6 e 24 horas depois. Três horas após o inóculo, houve aumento das concentrações séricas de cortisol em peixes de todos os tratamentos, exceto naqueles que receberam 2% do extrato de *A. vera*. As concentrações plasmáticas de glicose se elevaram 3 horas após o inóculo em peixes de todos os tratamentos, e os valores se reduzem às 6 horas, significativamente mais nos peixes tratados com o extrato. A atividade respiratória dos leucócitos (ARL) foi reduzida pelo extrato de *A. vera* (1,0% e 2,0%) após 15 dias de alimentação (basal), observando-se ativação nestes dois grupos de peixes 3 horas após a inoculação da bactéria. As concentrações da lisozima sérica de peixes do grupo controle aumentaram 3 horas após inoculação e se mantiveram até 24 h, enquanto nos peixes que receberam *A. vera* o aumento foi atenuado nesta amostragem. Observamos aumento das concentrações a partir de 6 horas. A alimentação dos peixes com 0,5 e 1% do extrato de *A. vera* por 15 dias aumentou a quantidade de lipídeo no fígado e no depósito visceral, observando-se redução deste estoque 3 h após a inoculação da bactéria nos peixes que receberam 0,5% do extrato. Concluimos que *A. vera* oferecida por 15 dias teve efeitos redutores de estresse, estimulou imunidade inata e promoveu lipogênese no músculo e nos depósitos viscerais, sendo este último mobilizado após o inóculo.

Palavras-chave: imunidade inata, metabolismo, extrato, plantas medicinais

Abstract

Aloe vera is a traditional medicinal plant. However, its use in fish is quite recent. We evaluated the effects of supplementation with *A. vera* in diet of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) on responses of stress, innate immunity and energy metabolism in fish inoculated with *Aeromonas hydrophila*. For 15 days, 192 fish were fed diets supplemented with 0% (control), 0.5%, 1.0% and 2.0% plant extract, then inoculated with inactivated bacteria and sampled at 3, 6 and 24 hours after. Three hours after inoculation, serum cortisol concentrations increased in fish from all treatments, except in those fed with 2% of *A. vera* showing a cortisol-reducing effect of the plant extract. Plasma glucose concentrations increased 3 h after inoculum in fish from all treatments and decreased at 3h, more intensily in fish fed with *A. vera*. Leukocyte respiratory activity (ARL) was reduced by *A. vera* extract (1.0% and 2.0%) after 15 days of feeding (basal), and activated in the same fish groups 3 hours after bacterial inoculation. The serum lysozyme

concentrations of control fish increased 3 hours after inoculation and remained until 24 h, while in fish fed with *A. vera* the increase was attenuated. We observed an increase in lysozyme concentrations 6 hours after inoculation. Feeding fish with 0.5 and 1% of *A. vera* for 15 days increased the amount of lipid in liver and visceral depots, with a reduction in visceral reserves 3 h after inoculation when fish fed 0.5% *A. vera*. We concluded that *A. vera* offered for 15 days showed stress-reducing effects, stimulated innate immunity and promoted lipogenesis in muscle and visceral deposits, that was mobilized 3 hours after inoculum.

Keywords: innate immunity, metabolism, extract, medicinal plants

Introdução

Com a população mundial em crescimento exponencial, há necessidade de suprir a demanda por alimento. Neste intuito, a aquicultura tem crescido como fonte no fornecimento de peixe para consumo humano (FAO, 2018). Todavia, junto com o aumento da produção, há desafios provenientes da intensificação dos sistemas produtivos aquícolas. Os principais problemas encontrados, atualmente, nos sistemas de criação estão relacionados ao estresse diário proveniente do manejo dos animais. Desta forma, muitos fatores podem favorecer surtos de doenças causados por patógenos ambientais oportunistas, trazendo prejuízos à atividade. Atualmente, existem vários métodos para tratamento de doenças em peixes, porém há uma preocupação em se buscar alternativas de controle que não influenciem o bem-estar dos animais e a degradação do ambiente natural. Algumas alternativas já estão se tornando obsoletas e não mais aceitas em diversas partes do mundo, como o uso de produtos químicos e antibióticos (Lückstädt, 2006). Assim, é necessário desenvolver tratamentos alternativos e ambientalmente corretos, como, por exemplo, o uso de substâncias imunoestimulantes que atuem na regulação imunológica de peixes, muitos com eficiência comprovada no controle de patógenos (Guardiola et al., 2016).

Dentre várias substâncias naturais que estimulam o sistema imunológico, as plantas medicinais vêm despertando o interesse do meio científico, não somente por apresentar propriedade de ativação do sistema imune, mas também por apresentarem outras funções, como promoção do crescimento, estimulação do apetite, controle de infestação parasitária, custo econômico acessível e maior biodegradabilidade em comparação com as drogas sintéticas (Jeney, 2009; Bairwa et al., 2012). Há uma tendência global de uso

de plantas medicinais na aquicultura como um método promissor e alternativo para prevenir e/ou controlar doenças de peixes (Reverter et al., 2014; Harihrishnan et al., 2011; Hai et al., 2015).

A *Aloe vera* é uma planta medicinal tradicionalmente muito importante, com amplas propriedades terapêuticas, que vão desde cicatrização até atividade anticancerígena (Hamman, 2008; Rajeswari et al., 2014; Sánchez-Machado et al., 2017). Porém, na aquicultura ainda é pouco estudada, embora alguns trabalhos tenham sido publicados nos últimos anos (Gabriel et al., 2015; Zanuzzo et al., 2015; Abdy et al., 2017). Isso estimula o desenvolvimento de estudos para se determinar suas propriedades fisiológicas, e desta forma, conhecer os mecanismos de ação e desenvolver produtos que atuem na promoção da saúde animal.

Portanto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar os efeitos de dietas suplementadas com extrato de *Aloe vera*, por 15 dias, sobre indicadores de estresse, imunidade inata e metabolismo, antes e após inoculação com *Aeromonas hydrophila* inativada. O modelo experimental foi o pacu, peixe com alto potencial de produção na América do Sul (Valladão et al., 2016) e que vem enfrentando surtos de doenças causados por infecção de agentes bacterianos em sistemas intensivos de produção (Ferreira et al., 2019).

Material e métodos

O procedimento experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 015618/18) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal, e foi realizado conforme os princípios éticos em experimentação animal segundo o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Animais e protocolo experimental

Foram utilizados 240 juvenis de pacu ($120,6 \pm 28,7$) fornecidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP). Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 24 caixas de polietileno, com volume útil de 100L, em um sistema de fluxo constante de água e aeração forçada. O fotoperíodo foi de 12 horas luz:12 horas de escuro. Os peixes

foram aclimatados às condições experimentais durante quinze dias, sendo alimentados até saciedade aparente, duas vezes ao dia com ração comercial (28% de PB e 3600 kcal de EB kg⁻¹). Neste período, o consumo de ração foi mensurado para a determinação do percentual de arraçoamento, com base na biomassa. A temperatura da água (29,06 ± 0,34 °C), a concentração de oxigênio dissolvido (7,60 ± 0,17 mg/L) e pH (7,6 ± 0,58) foram monitoradas durante todo o período experimental.

Após a aclimação, os animais foram pesados e distribuídos conforme os seguintes tratamentos:

Grupo Aloe Free – alimentação com ração comercial sem adição de *Aloe vera*.

Grupo T1 – alimentação com ração comercial com a inclusão de 0,5% de *Aloe vera*.

Grupo T2 - alimentação com ração comercial com a inclusão de 1,0% de *Aloe vera*.

Grupo T3 - alimentação com ração comercial com a inclusão de 2,0% de *Aloe vera*.

Cada tratamento teve seis réplicas, com 10 peixes por réplica. Os peixes então foram alimentados duas vezes ao dia (9:00 e 16:00), durante 15 dias, com 3% da biomassa de cada réplica.

Preparação das dietas

As dietas experimentais foram preparadas pela moagem de ração comercial extrusada (28% de PB e 3600 kcal de EB kg⁻¹), para a incorporação de 0%; 0,5%; 1,0% e 2,0% de extrato de *Aloe vera* e constituição dos tratamentos *Aloe free*, *T1*, *T2* e *T3* respectivamente. Em seguida, o alimento foi umedecido e passado por uma peletizadora e seco em estufa de recirculação de ar, a 55°C, por 24 horas. O extrato de *A. vera* utilizado foi proveniente da empresa Nature's Oil, com 100% de pureza (lote 24228).

Preparação da bactéria *Aeromonas hydrophila* para inoculação

A suspensão bacteriana utilizada para a inoculação dos animais foi fornecida pelo Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do CAUNESP. Uma alíquota da cepa de *A. hydrophila* foi adicionada a um meio de cultura de caldo tripton de soja estéril. Esta suspensão foi incubada numa temperatura de 30 graus durante 24 horas e depois centrifugada 3000 rpm, durante 10 min. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento lavado três vezes com tampão PBS (0,01M). Depois disto, a suspensão

bacteriana menor que a DL50 foi (1×10^8 UFC mL) ajustada em espectrofotometria, inativada em banho maria a 40°C, durante 30 min, segundo metodologia de Castro et al. (2014).

Coletas e Análises

Após 15 dias de alimentação experimental, 12 peixes de cada tratamento foram anestesiados (benzocaína, 0,1 g L⁻¹) para coleta sanguínea e medidas corporais, sendo esta, a coleta basal. Em seguida, os animais foram inoculados com a bactéria *A. hydrophila*, através de injeção intraperitoneal, e amostrados 3, 6 e 24 horas após a inoculação. A coleta sanguínea se deu por punção de vasos caudais, sendo alíquotas do sangue separadas em microtubos que continham ou não anticoagulante. O sangue dispensado em microtubos que não continham anticoagulante foram mantidos resfriados por 3 horas e depois centrifugados para separação do soro (8000 x g, 10 min). Amostras de sangue em microtubos que continham anticoagulante foram centrifugados para separação do plasma (8000 x g, 10 min). Posteriormente, os animais foram eutanasiados por alta dose de benzocaína e coletadas amostras de músculo branco, fígado, baço e gordura visceral. O fígado, baço e gordura visceral foram pesados para determinação dos índices hepato-somático espleno-somático e gorduro-viscero-somático [(peso do órgão / peso corporal)*100, respectivamente]. As amostras de fígado e músculo branco foram congeladas e mantidas a - 20 °C para posterior determinação de glicogênio hepático, lipídio total hepático e muscular.

Indicadores de imunidade inata

No sangue total foi determinada a atividade respiratória dos leucócitos, utilizando-se NBT (Nitro tetrazolium blue chloride - Sigma Aldrich - N6876), de acordo com protocolo de Anderson & Siwicki (1995), modificado por Biller-Takahashi et al. (2013) para pacu. Imediatamente após a coleta de sangue e mistura com heparina, 50 µL foram incubados com um volume igual de tampão NBT (0,2%), à temperatura ambiente, por 30 min. Posteriormente, 1 mL de DMF (Dimetilformamida, Sigma Aldrich - 227056) foi adicionado às amostras e estas foram lidas utilizando um espectrofotômetro (Thermo Scientific; Genesys 10S), à temperatura ambiente, a 540 nm

A concentração da lisozima foi medida no soro através de ensaio turbidimétrico como descrito por Ellis (1990). Como curva padrão, foi utilizada clara de ovo de galinha (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O ensaio foi iniciado através de diluições da solução padrão e do soro em volume fixo (25µl) numa microplaca de 96 poços em triplicata. 175 µl de uma solução de 20 mg de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em 100 mL de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2) foi então adicionada em cada poço. Após mistura rápida, a absorbância foi medida a 450nm, a cada 20s, por 10 min, com leitor de microplacas (Benchmark, Biorad, EUA). Os resultados foram expressos em ng de lisozima por µL de soro. Uma unidade é definida como a quantidade de amostra necessária para reduzir a absorbância em 0,001 / min a 450 nm em comparação com o controle (suspensão de *M. lysodeikticus* sem soro).

A atividade hemolítica do sistema complemento foi avaliada no soro usando a via alternativa do complemento (ACP₅₀) de acordo com Zanuzzo et al. (2015). Sangue de coelho foi coletado e processado para isolar hemácias, cuja suspensão foi adicionada ao soro, num volume fixo de 400µl de solução de hemácias + 100µl de soro combinado com 100 µl de tampão EGTAMg²⁺, relação determinada através de uma análise prévia que foi feita misturando-se um pool de todas as amostras de soro. Em seguida, a atividade hemolítica do complemento foi medida como o tempo (em segundos) necessário para lisar 50% de hemácias, em ensaio cinético, a 700 nm usando um espectrofotômetro Genesis 10S (Thermo Scientific®).

Indicadores de estresse

No soro foram determinadas as concentrações de glicose e cortisol. As concentrações de cortisol foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) com um kit comercial (DRG® Cortisol ELISA, EIA-1887; DRG International, Inc., EUA; <http://www.drg-international.com>). As concentrações de glicose foram determinadas por método enzimático (kit Labtest, São Paulo, Brasil, referência 133), seguindo as instruções do fabricante

Indicadores metabólicos

No soro, foram determinadas as concentrações de triglicerídeo e colesterol, por método colorimétrico, por meio de kits comerciais, seguindo as instruções do fabricante (kit Labtest, São Paulo, Brasil, referência 87 e 76, respectivamente).

As amostras de fígado e músculo branco foram utilizadas para determinação de glicogênio hepático, segundo Perry et al. (1988), lipídio total hepático e muscular, segundo metodologia de extração de Folchet al. (1957) adaptada por Parrish (1999) e determinação de acordo com Frings et al. (1972).

Análises Estatísticas

Todos os dados foram analisados com o SAS (Statistical Analysis System, versão 9.2, Cary, NC, EUA) em um delineamento fatorial de 4 (dietas) x 4 (amostragens). Quanto aos dados do experimento, alguns foram transformados antes da análise estatística, pois não se apresentaram normais (Cramer-von Mises) e/ou homocedásticos (Brown-Forsythe). Estas transformações foram: Log10 (cortisol), INVERSE (IBS %) e SQRT (glicose). Posteriormente foi aplicado o teste de Duncan para comparação das médias. $P < 0,05$ foi utilizado como nível de significância estatística em todas as análises.

Resultados

Neste estudo, nós alimentamos pacus juvenis durante 15 dias com dietas suplementadas com extrato de *A. vera* e inoculamos os animais com a bactéria *A. hydrophila* inativada para avaliar respostas de estresse, da imunidade inata e do metabolismo energético dos peixes. Não houve mortalidade durante o período experimental.

Indicadores de imunidade inata

Em relação à ARL (Fig. 2 A), observamos que, na coleta basal, os grupos tratados com 1,0% e 2,0% de *Aloe vera* apresentaram valores mais baixos. Três horas após a injeção do inóculo, a ARL aumentou nestes mesmos peixes ($p=0,002$), começando a

reduzir às seis horas e voltando aos valores basais 24 depois, quando a ARL de todos os grupos era semelhante.

As concentrações da lisozima sérica de peixes do grupo controle aumentaram 3 horas após inoculação e se mantiveram até 24 h (Fig. 2 B), mas o mesmo não ocorreu com as concentrações da lisozima dos peixes que receberam o extrato da planta, que se mantiveram nos mesmo níveis que os observados na coleta basal, aumentando a partir de 6 horas após a inoculação da bactéria ($p<0.05$). Às 24 horas, o aumento foi significativamente maior ($p=0,0002$) nos peixes alimentados com 2,0 % do extrato.

Em relação à AHC (Fig. 2 C), não observamos diferenças significativas, tanto quanto a injeção do inóculo da bactéria, como ao extrato de *A. vera* ($p>0,05$).

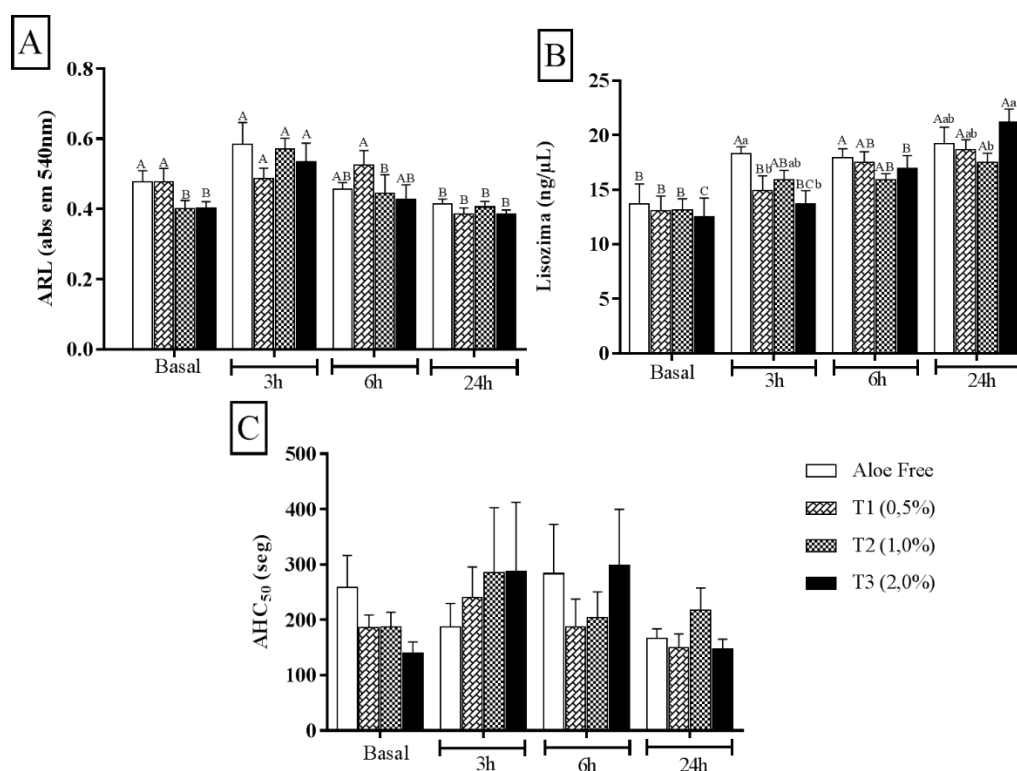


Figura 2: Atividade respiratória dos leucócitos (A), concentração sérica de lisozima (B) e atividade hemolítica do sistema complemento (C) de pacus alimentados por 7 dias com dietas suplementadas com *Aloe vera*, antes (basal) e 3, 6 e 24 horas após inoculação com *Aeromonas hydrophila* inativada. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos na mesma amostragem. Letras maiúsculas indicam diferenças de cada tratamento entre os tempos de amostragem. Ausência de letras indica falta de diferença.

Indicadores de estresse

Três horas após o inóculo de *A. hydrophila*, observamos aumento das concentrações plasmáticas de cortisol ($p=0,0194$), em peixes de todos os tratamentos, exceto naqueles alimentados com 2% do extrato de *A. vera* (Fig. 1 A). Seis horas após o inóculo, observamos redução das concentrações do hormônio nos peixes controle e nos que receberam 0,5% do extrato. Nos peixes que receberam 1 e 2%, os valores continuaram semelhantes aos observados às 3 h, e às 24 h, os valores para todos os tratamentos voltam aos valores observados na coleta basal.

Em relação à glicose (Fig. 1 B), observamos aumento das concentrações plasmáticas três horas após inóculo da bactéria ($p=0,0021$) em peixes de todos os tratamentos e, às 6 h, as concentrações diminuem nos peixes de todos os grupos, sendo menores nos peixes que receberam o extrato. Às 24 h, as concentrações, nos peixes alimentados com *A. vera*, retornam aos valores observados às 3 h.

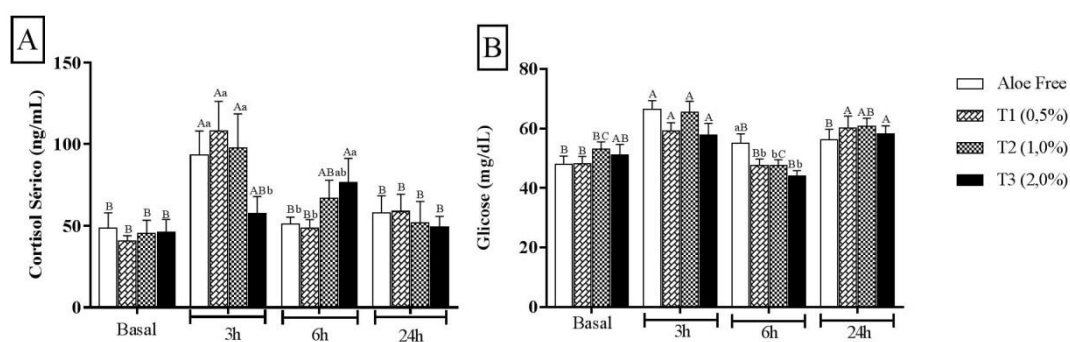


Figura 1. Concentrações séricas de cortisol (A) e de glicose (B) de pacus alimentados por 15 dias com dietas suplementadas com *Aloe vera*, antes (basal) e 3, 6 e 24 horas após inoculação com *Aeromonas hydrophila* inativada. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos na mesma amostragem. Letras maiúsculas indicam diferenças de cada tratamento entre os tempos de amostragem. Ausência de letras indica falta de diferença. N=8

Indicadores metabólicos sanguíneos

A inclusão de *A. vera* nas dietas não influenciou as concentrações séricas de colesterol e triglicerídeos após 15 dias de alimentação ($p>0,05$) (Fig. 3 A e B).

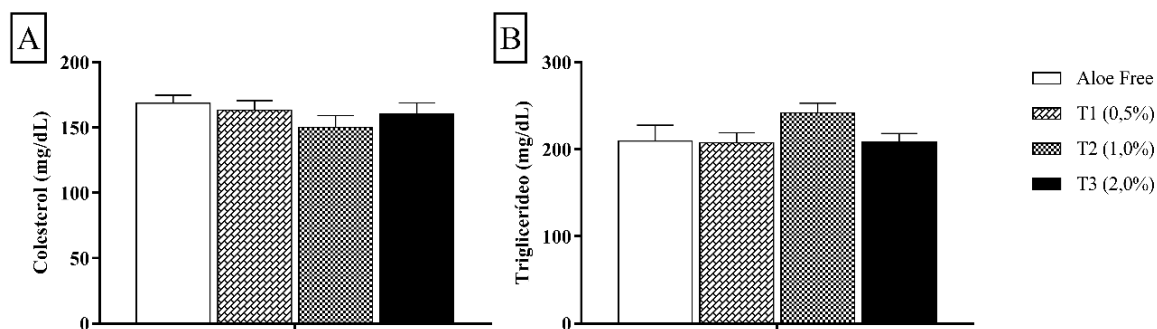


Figura 3. Concentrações séricas de colesterol e triglicerídeos de pacus alimentados por 7 dias com dietas suplementadas com *Aloe vera*. Ausência de letras indica falta de diferença.

Indicadores metabólicos teciduais

Ao final do período de 15 dias de alimentação com *A. vera*, observamos que as concentrações de lipídio total hepático não se alteraram (Fig. 4 A), porém houve um aumento das concentrações para lipídio muscular (Fig. 4 B) nos peixes que receberam 0,5 e 1% do extrato de *A. vera* ($p=0,01805$), quando comparado aos peixes controle e aos que receberam 2% do extrato. Os valores mais altos foram observados no grupo que recebeu 0,5% de inclusão.

Em relação às concentrações de glicogênio hepático (Fig. 4 C), não houve influência da inclusão do extrato de *A. vera* após 15 dias de alimentação.

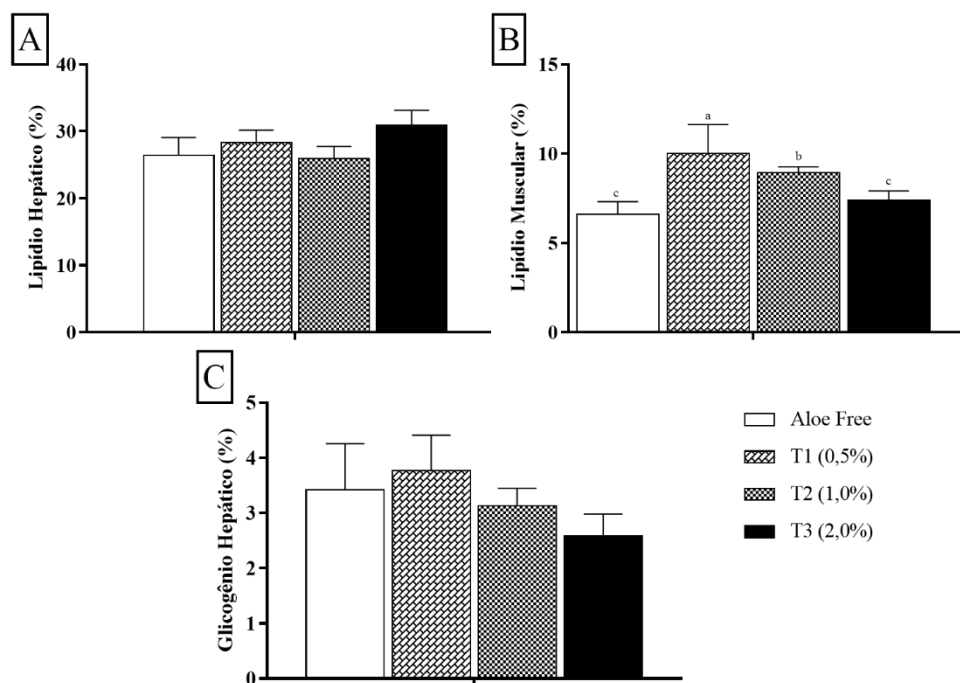


Figura 4. Concentrações de lipídeo total hepático (A), e muscular (B) e glicogênio hepático (C) de pacus alimentados por 15 dias com dietas suplementadas com *Aloe vera*, antes (basal). Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos na mesma amostragem. Ausência de letras indica falta de diferença.

Índices somáticos

A alimentação por 15 dias com extrato de *A. vera* não influenciou ao IES e também não observamos alteração nos valores 3 horas após a inoculação da bactéria (Fig. 5 A). Em relação ao IGVS, observamos aumento do depósito de gordura visceral nos peixes que receberam 0,5 e 1% do extrato de *A. vera*. Três horas após a inoculação da bactéria, o IGVS reduziu no grupo alimentado com 0,5% (Fig. 5 B). A alimentação com o extrato afetou estatisticamente o IHS (Fig. 5 C) na coleta basal ($p=0,0326$), apresentando valores significativamente diferentes para o grupo que recebeu 0,5% de extrato. Três horas após a inoculação bacteriana, observamos redução neste grupo.

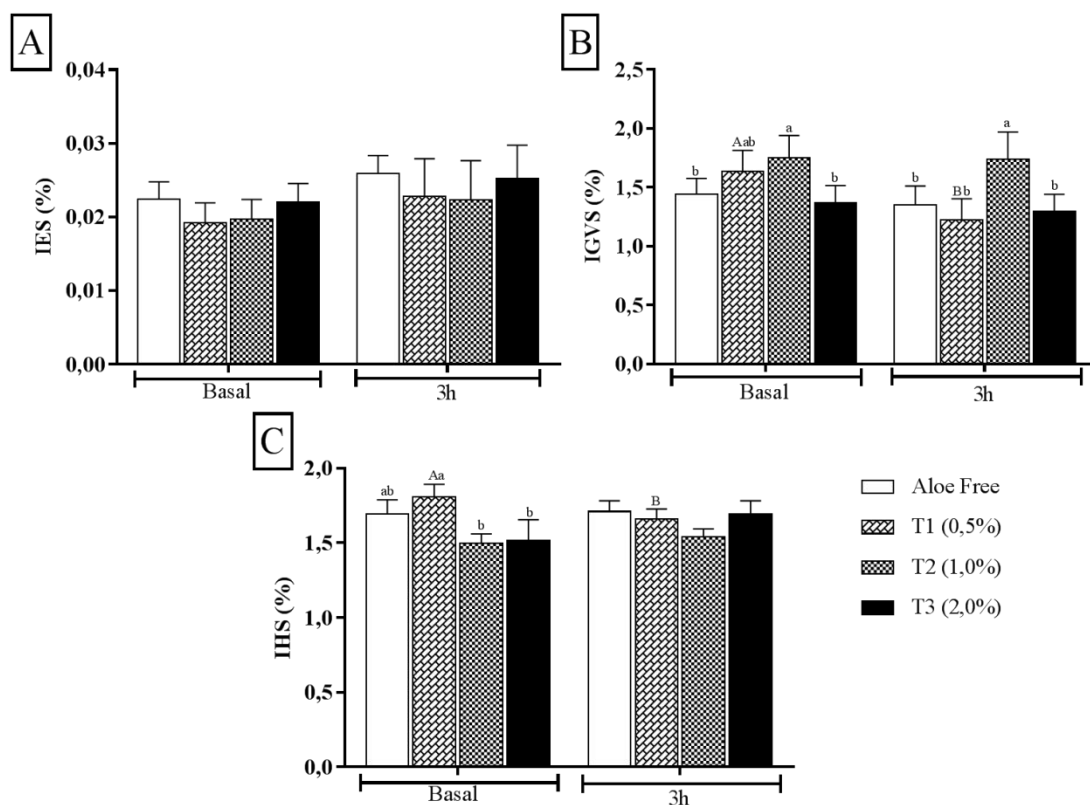


Figura 5. Índice espleno-somático (A), índice gorduro-viscero-somático (B) e índice hepato-somático (C) de pacu alimentados por 15 dias com dietas suplementadas com *Aloe vera*, antes (basal) e 3 horas depois da inoculação com *Aeromonas hydrophila* inativada. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos na mesma amostragem. Letras maiúsculas indicam diferenças de cada tratamento entre os tempos de amostragem. Ausência de letras indica falta de diferença.

Discussão

A *Aloe vera* é uma planta utilizada mundialmente por apresentar propriedades benéficas na medicina humana. Atualmente, a utilização de produtos naturais à base de plantas vem sendo estudada como estratégia alternativa na manutenção da higidez dos peixes na aquicultura (Lieke et al 2019), embora pouco se conheça sobre os efeitos fisiológicos da *A. vera* em peixes. Após alimentar juvenis de pacu com dietas suplementadas com o extrato da planta, por 15 dias, inoculamos os peixes com

Aeromonas hydrophila e observamos efeitos redutor de estresse, imunestimulante e lipogênico da *A. vera*.

A inoculação dos peixes com a bactéria inativada teve efeito estressor, pois elevou os níveis do cortisol circulante, 3 horas após o inóculo, porém, nos animais que foram alimentados com a dieta suplementada com 2% do extrato de *A. vera*, observamos que a planta promoveu redução dos níveis de cortisol. Em experimento apresentado no capítulo 2 desta tese, foi possível observar este mesmo efeito redutor de estresse quando juvenis de pacu foram alimentados com o mesmo extrato, nas mesmas concentrações, por tempo menor (7dias). A diferença entre os resultados dos dois experimentos é que o efeito redutor de cortisol, após 7 dias de alimentação foi observado antes da inoculação, com potenciação da resposta após inoculação da bactéria *A. hydrophila*. Ainda muito pouco se sabe sobre este efeito modulador da planta sobre o cortisol. Além do presente estudo, e do estudo referido no cap. 2 desta tese, outro trabalho com o mesmo peixe (Zanuzzo et al 2017) utilizou suplementação dietética com extrato de *A. vera* por 10 dias e expôs os peixes a um estressor de manejo (transporte) seguido de inoculação *A. hydrophila*. O estudo encontrou níveis de cortisol aumentados após transporte, relacionados à suplementação com o extrato, seguido de redução de nova elevação do hormônio causada pela inoculação bacteriana. Os resultados dos 3 estudos juntos sugerem ação protetora da *A. vera*, embora não seja possível estabelecer uma explicação para tal mecanismo. A composição química do gel da planta apresenta mais de 200 compostos bioativos (Ahlawat e Khatkar 2011), que podem estar agindo sinergicamente (Hamman 2008), de diferentes maneiras para explicar a modulação observada. Nossos resultados acrescentam à literatura um efeito da planta ainda não relatado, na modulação dos níveis de cortisol em peixes.

A abordagem imunológica de nosso estudo tem duas vertentes. A primeira se relaciona ao fato de que os mecanismos imunológicos são regulados pela secreção de hormônios, principalmente cortisol (Yada e Tort 2016), hormônio que foi afetado pela *A. vera* em nosso estudo, e, a segunda, pelo vasto conhecimento de que esta planta tem conhecido efeito imunestimulante (Hamman 2008; Rajeswari et al 2014).

Um dos componentes do sistema imunológico inato que atua na defesa do organismo é a explosão oxidativa, processo que ocorre durante a respiração dos leucócitos, quando ativados (Neumann et al 2001), com a função inicial de limitar a

disseminação ou crescimento de patógenos invasores. Neste processo, são produzidas espécies reativas de oxigênio/EROs pelos fagócitos (Havixbeck e Barreda 2015; Nguyen et al 2017). Através da injeção de bactéria inativada, nossos resultados mostraram ativação na produção de EROs 3 horas após o inoculo, mais significativamente em peixes alimentados com *A. vera*. Mehrabi et al (2019) também encontraram aumento da atividade da explosão respiratória em truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com *A. vera*, mas estes autores utilizaram protocolo experimental bastante diferente daquele de nosso estudo, ou seja, 5, 10 e 15 g extrato / kg ração, durante 8 semanas de alimentação. Nosso estudo mostrou que a *A. vera* pode atuar com concentração muito mais reduzida e oferecida por tempo muito mais curto. No mesmo sentido que nosso estudo, Im et al (2005) mostraram, usando polissacarídeos isolados do gel de *Aloe*, que moléculas entre 400 e 5 kDa (kilodaltons) exibiam a atividade ativadora de macrófagos mais potente. Já Zanuzzo et al (2017), utilizando um protocolo experimental diferente do nosso, mostraram que o transporte de pacu reduziu a produção de EROs, mas a *A. vera* desencadeou um efeito protetor na atividade fagocítica em peixes.

Um agente, tanto endógeno como exógeno, no combate à invasão microbiana, com função de digerir componentes da parede celular do patógeno é a lisozima, que tem função de ativar o sistema complemento e os fagócitos (Saurabh e Sahoo 2008). Em nosso estudo, o aumento das concentrações de lisozima observado nos peixes controle 3 horas após a inoculação bacteriana foi prevenido nos peixes que receberam o extrato da planta. Em seguida, as respostas se igualam e a concentração mais elevada do extrato promove a maior ativação 24 horas após o inóculo. Ainda não é claro o mecanismo de modulação da lisozima pela *A. vera*, observado neste estudo, da mesma forma que foi observado no estudo apresentado no cap. 2 desta tese. Outros estudos que mostraram estimulação de lisozima pela *A. vera*, utilizaram protocolos experimentais diferentes, como maiores concentrações e maior tempo de administração, além de manejos adicionais. Mehrabi et al (2019) encontraram níveis mais altos de lisozima quando alimentaram truta arco-iris por 8 semanas. Já Moghaddam et al (2017) descreveram o efeito estimulante da planta sobre os níveis de lisozima, em esturjão siberiano (*Acipenser baerii*), com suplementação de 1,5% do extrato num período de 60 dias. Nosso estudo mostra a ação eficiente do extrato numa utilização mais racional e econômica. Esse efeito benéfico no sistema imune, em estratégia de tratamento em tempo e com concentrações mais reduzidas do extrato, também foi evidenciado por Zanuzzo et al (2017) na mesma espécie de peixe. Os

autores observaram melhora nas respostas da lisozima no pacu alimentado por 10 dias, com concentrações do extrato de *A. vera* semelhantes às que utilizamos após transporte dos peixes.

As respostas ativadoras da *A. vera* observadas na ARL e perfil de lisozima sérica não foram observadas no outro indicador do sistema imune, o sistema complemento, que atua na detecção de patógenos e reconhecimento pelos fagócitos (Boshra e Sunyer 2006). Um indicador adicional da ativação do sistema imune utilizado neste estudo foi o aumento do tamanho do baço. Embora o baço sirva como um dos principais órgãos hematopoiéticos nos teleósteos e cuja ativação na produção de célula pode causar hiperplasia do órgão (Agius e Roberts 2003), não observamos alteração no aumento do baço que pudesse ser associado à ativação do sistema imune.

Um aspecto inovador deste estudo é o efeito da *A. vera* no metabolismo energético de peixes e que foi abordado também no cap. 2 desta tese. O extrato influenciou a dinâmica de reservas de lipídeos corporais, atuou como agente lipogênico e aumentou os estoques nos músculos e vísceras, reservas energéticas importantes nos peixes (Sheridan 1994). O conhecimento desta ação da *A. vera* é subsídio para se estabelecer estratégias de manejo dos peixes em períodos críticos, com função de preservação das reservas energéticas. Poucos estudos estão disponíveis para embasar nossos, sendo maior parte deles em humanos, relacionados com distúrbios metabólicos, corrigindo níveis glicêmicos e diminuindo a resistência à insulina, ou reduzindo níveis circulantes de colesterol e triglicerídeos (Rajasekaran et al 2006; Choudhary et 2014; Alinejad-Mofrad et al 2015; Pothuraju et al 2016). Da mesma forma, em peixes, de nosso conhecimento, os estudos abordando aspectos metabólicos da *A. vera* são escassos. Há evidências de redução do colesterol sanguíneo em juvenis de *Carassius auratus*, suplementados com 2% de *A. vera* por 30 dias (Palermo et al 2013), e redução de colesterol e triacilglicerol, além de elevação dos níveis de lipoproteínas de alta densidade, em tilápias GIFT (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com concentrações que variaram de 0,5 a 4% por 8 semanas (Gabriel et al 2015). Ao contrário dos estudos citados não encontramos alterações nos níveis basais de colesterol e triglicerídeos no sangue após a alimentação do pacu com *A. vera* por 15 dias.

Concluindo, o uso de extrato de *A. vera*, como suplemento dietético, por até 15 dias, pode ser recomendado na alimentação de pacu, por suas propriedades redutora de

estresse, imunestimulante e moduladora de reservas energéticos durante diferentes fases da criação da espécie.

Referências

Abdy E, Alishahi M, Tollabi M, Ghorbanpour M, Mohammadian T (2017) Comparative effects of *Aloe vera* gel and Freund's adjuvant in vaccination of common carp (*Cyprinus carpio* L.) against *Aeromonas hydrophila*. *Aquac Int* 25:727–742

Agius C, Roberts RJ (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis* 26:499-509

Ahlawat KS, Khatkar BS (2011) Processing, food applications and safety of *aloe vera* products: A review. *J Food Sci Technol* 48:525-533

Alinejad-Mofrad S, Foadoddini M, Saadatjoo SA, Shayesteh M (2015) Improvement of glucose and lipid profile status with *Aloe vera* in pre-diabetic subjects: a randomized controlled-trial. *J Diab Met Dis* 14:22

Bairwa MK, Jakhar JK, Satyanarayana Y, Devivaraprasad A (2012) Reddy. Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. *J Nat Prod Plant Resour* 2 (3):397-400 Choudhary M, Kochhar A, Sangha J (2014) Hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Aloe vera* L. in non-insulin dependent diabetics. *J Food Sci Technol* 51:90–96

Biller-Takahashi JD, Takahashi LS, Saita MV, Gimbo RY, Urbinati EC (2013) Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*, *Braz J Biol* 73:425-429

Boshra H, Li J, Sunyer JP (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 20:239–262

Ferreira MW, Santos RM, Silva AR, Marino ED, Makimoto SS, Barbosa GRC, Andrade GB (2019) Mortality in Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) caused by *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas aeruginosa* in Excavated Tank. *Acta Scientiae Veter* 47:379 Guardiola FA, Porcino C, Cerezuela R, Cuesta A, Faggio C, Esteban MA, (2016)

Frings CS, Fendly TW, Dunn RT, C.A (1972) Quenn, Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. Clin Chem 18:673-674FAO (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture. Available at: <http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>

Gabriel NN, Wilhelm MR, Habte-Tsion HM, Chimwamurombe P, Omoregie E, Ipinge LN, Shimooshili K (2019) Effect of dietary *Aloe vera* polysaccharides supplementation on growth performance, feed utilization, hemato-biochemical parameters, and survival at low pH in African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings. Int Aquat Res 11:57–72

Gabriel NN, Qiang J, He J, Ma XY, Kpundeh MD, Xu P (2015) Dietary *Aloe vera* supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). Fish Shellfish Immunol 44:504-514.

Hai NV (2015) The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review, Aquaculture 446:88-96

Hamman JH (2008) Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. Molecules 13:1599–1616Havixbeck JJ, Barreda DR (2015) Neutrophil development, migration, and function in teleost fish. Biology 4:715-734

Harikrishnan R, Kim JS, Kim MC, Balasundaram C, Heo MS (2011) *Prunella vulgaris* enhances the non-specific immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Uronema marinum*. Aquaculture 318:61-66

Im SA, Oh ST, Song S, Kim MR, Kim DS, Woo SS, Jo TH, Park YI, Lee CK (2005) Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. Int Immunopharmacol 5:271-279

Jeney G, Yin G, Ardo L, Jeney Z (2009). The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. Fish Physiology and Biochemistry 35:669-676

Kumar KPS, Bhowmik D. (2014) *Aloe vera*: The Miracle Plant Its Medicinal and Traditional Uses in India. J Pharmacogn Phytochem 1:118-124

Lieke T, Meinelt T, Hoseinifar SH, Pan B, Straus DL, Steinberg CEW (2019). Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Rev Aquac* 1–23

Lückstädt C (2006) Acidifiers in aquaculture prove beneficial. New methods, data, trends and interpretation. *Fresh from the laboratory*. 14

Mehrabi Z, Firouzbakhsh F, Rahimi-Mianji G, Paknejad H (2019) Immunostimulatory effect of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) on non-specific immune response, immune gene expression, and experimental challenge with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 503:330–338

Moghaddam SB, Haghighi M, Rohani MS, Hamidi M, Ghasemi M (2017) The effects of different levels of *Aloe vera* extract on some of the hematological and non-specific immune parameters in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), *Iranian J Fish. Sci* 16:1234–1247

Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., Belosevic, M. (2001) Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev Comp Immunol* 25:807– 825

Nguyen GT, Green ER, Meccas J. (2017) Neutrophils to the ROScues: mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7:373

Palermo FA, Cocci P, Angeletti M, Felici A, Polzonetti-Magni AM, Mosconi G (2013) Dietary *Aloe vera* components' effects on cholesterol lowering and estrogenic responses in juvenile goldfish, *Carassius auratus*. *Fish Physiol Biochem* 39:851–861

Parrish CC (1999) Determination of Total Lipid, Lipid Classes, and Fatty Acids in Aquatic Samples, in *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer, New York, NY 4-20

Pothuraju R, Sharma RK, Onteru SK, Shaik SS (2016) A. Hussain Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of *Aloe vera* Extract Preparations: A Review. *Phytother Res* 30:200–207

Rajeswari R, Umadevi M, Rahale CS, Pushpa R, Selvavenkadesh S, Kumar KPS, Bhowmik D (2014) *Aloe vera*: The Miracle Plant Its Medicinal and Traditional Uses in India. *J Pharmacogn Phytochem* 1:118-124

Rajasekaran R, Ravi K, Sivagnanam K, Subramanian S. (2006) Beneficial effects of *aloe vera* leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. Clin Exp Pharmacol Physiol 33:232–237

Reverter M, Bontemps N, Lecchini N, Banaigs B, Sasal P (2014) Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. Aquaculture 433:50-61

Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, Sendón R, Sanches-Silva A (2017) *Aloe vera*: Ancient knowledge with new frontiers. J Food Sci Technol 61:94-102

Saurabh S, Sahoo PK (2008) Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquacult Res 39:223-239

Sheridan MA (1994) Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. J Comp Biochem Physiol B 107:495-508

Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F (2016) South American fish for continental aquaculture. Rev Aquac 10:351–369

Yada T, Tort L (2016) Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions, Fish Physiology - Biology of Stress in Fish. 35:365–403

Zanuzzo FS, Sabioni RE, Montoya LNF, Favero G, Urbinati EC (2017) *Aloe vera* enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. Fish Shellfish Immunol 65:198–205

Zanuzzo FS, Zaiden F, Senhorini JA, Marzocchi- Machado CM, Urbinati EC (2015) *Aloe vera* bath improved physical and humoral protection in breeding stock of matrinxã (*Brycon amazonicus*) after induced spawning. Fish Shellfish Immunol 45:132-140

CAPÍTULO 4

Considerações finais

Considerações finais

Com a crescente expansão da produção de pescado no mundo, aumenta o desafio para se produzir peixes, de forma mais rentável, sustentável e ambientalmente correta. Esta intensificação da produção que leva à intensificação dos manejos, não pode ser evitada embora seja, muitas vezes, baseada em práticas invasivas para os peixes, que podem afetar sua saúde, promovendo um ambiente potencialmente estressante, capaz de gerar proliferação de patógenos, doenças e até mortalidade.

Nosso estudo, realizado por meio de dois experimentos, abordou o uso de uma estratégia alternativa, com o uso de produto de origem vegetal, natural, como suplemento na alimentação, para promover a melhora e reforço das respostas imunológicas de pacus juvenis para prepará-los para desafios impostos pelos sistemas de produção. Nossa estratégia foi a adição de extrato de *Aloe vera* na dieta dos peixes. A *A. vera* é um imunostimulante natural que tem mostrado resultados positivos na melhora das respostas imunes inatas humorais e celulares contra doenças infecciosas em peixes.

A *A. vera* mostrou um papel redutor dos níveis de cortisol em condições basais, quando os peixes foram alimentados com a planta por 7 dias, como também, quando receberam o extrato por 15 dias, situação em que o efeito redutor dos níveis de cortisol foi observado em resposta à inoculação bacteriana.

A inclusão de *A. vera* na dieta para pacu promoveu eficazmente a ativação das respostas imunitárias, tanto para 7 dias de alimentação como para 15 dias. No presente estudo, com base em nossos resultados, propomos que a *A. vera* tem um alto potencial como imunostimulante para peixes, sugerindo que novas abordagens sejam estudadas para se entender os mecanismos de ação da planta.

Ressaltamos ainda, como resultado ainda não descrito, que a *A. vera* modulou o metabolismo de lipídeos e promoveu lipogênese no fígado, músculo e depósito visceral, indicando uma ação protetora dos lipídios, tanto em peixes alimentados por 7 quanto por 15 dias.

Este estudo mostra o potencial da utilização de alimentos funcionais durante a produção do pacu, com a adição de *A. vera* nas dietas, podendo ser oferecido por 7 dias, antes de práticas de manejos previstos como captura, despesca, transporte, entre outros. Nosso protocolo visa melhorar os mecanismos de defesa e diminuição de estresse do peixe, gerando desta forma produtos de alta qualidade e higidez, sem prejuízos econômicos ao meio ambiente.