

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

Uso de saponina de quilaia
(*Quillaja saponaria* Molina)
em juvenis de pacu

Rosangela do Nascimento Fernandes

Jaboticabal – SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

Uso de saponina de quilaia
(*Quillaja saponaria* Molina)
em juvenis de pacu

Rosangela do Nascimento Fernandes

Orientadora: Prof^a Dr^a Elisabeth Criscuolo Urbinati

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Aquicultura

Jaboticabal – SP
2014

F363u Fernandes, Rosangela do Nascimento
 Uso de saponina de quilaia (*Quillaja saponaria* Molina) em juvenis
de pacu / Rosangela do Nascimento Fernandes. – – Jaboticabal, 2014
viii, 103f. : il. ; 28 cm

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2014

 Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

 Banca examinadora: Eduardo Gianini Abimorad, Flávio Ruas de
Moraes, Marco Antônio de Andrade Belo, Leonardo Susumu
Takahashi.

 Bibliografia

 1. Desafio. 2. Imunidade não específica. 3. Triglicerídeos. I. Título.
II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Uso de saponina de quilaia (Quillaja saponaria Molina) em juvenis de pacu

AUTORA: ROSANGELA DO NASCIMENTO FERNANDES

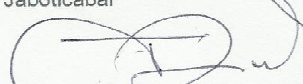
ORIENTADORA: Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Aprovada 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 / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
de Jaboticabal



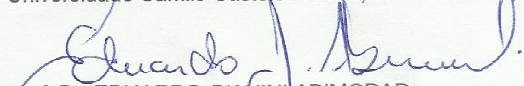
Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal



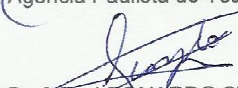
Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Universidade Camilo Castelo Branco, UNICASTELO, Descalvado-SP



Prof. Dr. EDUARDO GIANINI ABIMORAD

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, APTA, Votuporanga-SP



Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI

Departamento de Zootecnia / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Dracena-
SP



Data da realização: 25 de fevereiro de 2014.

A Deus, pela vida e porque com Ele tudo é possível.

Aos meus pais, Obelisto e Rosa, por me mostrarem desde cedo o que é batalhar por um futuro melhor, por nunca desistir dos objetivos e, enfim, pelo apoio, amor, compreensão e caráter.

A minha querida irmã Renata pelo apoio, compreensão e orgulho mútuo.

A minha sobrinha Mariane, pelo amor 'inexplicável' que sinto por ela.

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Elisabeth Criscuolo Urbinati, antes de tudo pela oportunidade e em aceitar me orientar, pela atenção, paciência e respeito. Também lhe agradeço pela generosa amizade! Suas qualidades nos transmitem energia e força para querermos ser melhores como profissionais e como pessoas.

Ao Prof. Dr. Sérgio Fonseca Zaiden da Faculdade de Rio Verde (GO), à Profª Drª Flora Helena D'Angelis e Profª Drª Márcia Rita Pacheco do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal (FCAV) pela amizade e pelo auxílio nas análises histológicas.

Aos professores Dr. Marco Antônio de Andrade Belo, Dr. Eduardo Gianini Abimorad, Dr. Flávio Ruas de Moraes, Dr. Leonardo Susumu Takahashi e à Drª Jaqueline Dalbello Biller-Takahashi, pela amizade, contribuição e sugestões ao trabalho na qualificação e defesa da tese.

À Silvinha do Laboratório de Nutrição, ao Valdecir do laboratório de peixes ornamentais, ao 'seu' Mauro, 'Perereca', Márcio da tilapicultura, a Suerli, ao David, a Veralice Capatto entre outros tantos funcionários que me auxiliaram de uma forma ou de outra na condução da minha pesquisa, agradeço pela força e amizade.

Aos meus queridos amigos de laboratório Rodrigo Gimbo, Fábio (Spinha), Rafael Sabioni, Marcos Saita, Jaque, Aninha, Camila, Talísia, Natália, Soliris, Damares, Gisele, Luís Enriquez, Bruno (Shrek), Ana Paula Montedor e Eduardo (Kotoko) entre outros que passaram com pressa ou estagiaram por um tempo, agradeço a companhia, as comilanças, a força na hora da dificuldade (experimentos) e na hora do divertimento (festas), enfim, agradeço a amizade de vocês por tudo isso e muito mais coisas que estou esquecendo aqui. Agradeço MUITO vocês meus amigos!!! Muito sucesso e luz para vocês!

Às minhas amigas e companheiras de anos de faculdade: Flávia Hermínia Vicente, Natália Bortoleto Athayde e Fabiana de Souza Costa, Graciela Pessoa Martins e

Luciana Rodrigues, pela amizade, compreensão, ajuda nos momentos difíceis, pelos desabafos e carinho. Muita luz na vida de vocês!!!

Aos meus amigos da época da iniciação científica e que me acompanharam de perto ou de longe até o presente momento: Igo Gomes Guimarães, Daniel Magalhães Araújo, Fernando Kojima Nakagome, Vivian Gomes, Caroline Teixeira, Xuxa, João Koch, Rafael Lopes, entre muitos outros que passaram pelo laboratório agradeço pelo apoio, ajuda, amizade e carinho.

Aos amigos do Caunesp Haluko Massago, Luis Gustavo Gianechinni (Pastor), Alexandre (Mossoró), Julian Castillo, Róberson Sakabe, Thais Vaz Farias, Fernanda Sebastião, José Dias, Cynthia Ikefuti, Eduardo Urbinati, Mariane Schorer, Patrick, Roosevelt Barbosa, Sílvia Patrícia (Pico), Eduardo Antônio Sanches, Fabrizia Otani (Moeda), Maria Paes, Francine, Regiane, Fernanda, Lidiane, Márcia Regina Stech, Carol Nebo, Juliana Tomomi, Hellen, Fernanda Carani, Bruna, Jesaias, Gel, Adriana Bordignon, Cleonice, Milena Chaguri, Flávia Abe, Gustavo (Vurto), Gustavo (Sumô), Renata, Ricardo Mori, Matheus, Sílvia (foca), entre outros (que posso estar esquecendo aqui) pela amizade, apoio, compreensão e momentos divertidíssimos que passei ao lado de vocês!

Aos professores do Caunesp e FCAV: Fabiana Pilarski, Wagner Valenti, Sérgio Batlouni, Laura Satiko, Dalton Carneiro, Lúcia Sipaúba, Luis Edivaldo Pezzato, Rosângela Zacarias, Kênia, Luciane, pela amizade, auxílio e respeito.

Aos amigos “extracurriculares” Célia da Silva Lima, Rosa Hainfellner, Elaine Bueno, Ysenia, Marcelo Donizete, entre outros pela amizade e pelos momentos alegres que passei ao lado de vocês.

Aos meus amigos e companheiros de aventuras do coral da Unesp: Tião (“mi marido”), ‘seu Vicente’, Renato, Luciano, André, Denise, Cida, Diná, Bruna, Renata, Marli, Mirela, Márcio, Adriana, Rosângela, Haydíl, Livia, Nilza, Sandra Sampaio, Suzana, José Ricardo, Cristina Emboaba entre outros que provavelmente estou esquecendo. A presença e a amizade de vocês foram fundamentais para minha permanência feliz em Jaboticabal,

*agradeço sempre a Deus por vocês terem ‘surgido’ na minha vida, assim como o coral!
Sucesso e muitas viagens internacionais cantarolísticas!!! rs*

À Dona Mercedes P. Calvo, pelo carinho, acolhimento e por ser minha mãe em Jaboticabal.

Ao meu cunhado Mauro César, pela amizade, por fazer minha irmã feliz e deixá-la menos estressada comigo.

Aos meus avós (já falecidos) Apolônia Pereira da Silva, Avandite dos Santos Fernandes e por último Sebastião José Fernandes pelo carinho, incentivo e por sempre acreditarem em mim. Por motivo da realização da minha pesquisa, peço desculpas aos meus familiares e principalmente a memória do meu avô por não ter comparecido ao seu velório e enterro.

Às minhas primas Vitória Carolina, Ana Carolina, Kênia Leme pelo carinho, apoio e a alegria que sinto em estar ao lado de vocês.

Enfim, agradeço todas as pessoas que acreditaram em mim e me apoiaram, de um modo ou de outro, favorecendo a realização da minha pesquisa.

APOIO FINANCEIRO

Bolsa concedida pelo CNPq – Processo 141388/2010-2

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, em 10 de fevereiro de 2011, sob o protocolo nº 000889/11.

“

Para acumular conhecimento, acrescente uma coisa nova todos os dias. Para acumular sabedoria, descarte algo todos os dias.”

(Lao Tsé)

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfo e glória, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito, que nem fazem muito e nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

“Não fique triste quando ninguém notar o que fez de bom. Afinal o sol faz um enorme espetáculo ao nascer e, mesmo assim, a maioria de nós continua dormindo”

(Charles Chaplin)

Sumário

APOIO FINANCEIRO	v
RESUMO GERAL	1
CAPÍTULO – I : CONSIDERAÇÕES INICIAIS	4
1.0. Manejo na piscicultura e resposta ao estresse	6
2.0. Sistema imune em peixes	8
2.1. Imunoestimulantes	11
2.2. Saponina	12
2.3. Quilaia (<i>Quillaja saponaria</i> Molina)	15
2.4. Saponinas em peixes	17
2.5. <i>Aeromonas hydrophila</i>	18
2.6. Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	19
3.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO – II : Efeitos do consumo de saponina de quilaia (<i>Quillaja saponaria</i> Molina) no desempenho, indicadores fisiológicos e histológicos do pacu	33
RESUMO	34
ABSTRACT	34
1.0. INTRODUÇÃO	35
2.0. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. Experimento	37
2.1.1. Acondicionamento e manejo dos peixes	37
2.1.2. Dietas experimentais	38
2.1.3. Coleta de material biológico	39
2.2. Análises	39
2.2.1. Variáveis de desempenho	39
2.2.2. Variáveis fisiológicas	40
2.2.3. Exame histológico	41
2.3. Análise estatística	41
3.0. RESULTADOS	42
3.1. Acondicionamento e manejo dos peixes	42
3.2. Variáveis de desempenho	42
3.3. Variáveis fisiológicas	43
3.4. Exame histológico	45
4.0. DISCUSSÃO	48

5.0. CONCLUSÕES	53
6.0. REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO – III: Efeito do consumo da saponina de Quilaia (<i>Quillaja saponaria</i> Molina) sobre variáveis imunes não específica do pacu	59
RESUMO	60
ABSTRACT	61
1.0. INTRODUÇÃO	62
2.0. MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1. Experimento	64
2.1.1. Acondicionamento e manejo dos peixes	65
2.1.2. Dietas experimentais	65
2.1.3. Coleta de material biológico	66
2.1.4. Desafio por <i>Aeromonas hydrophila</i>	66
2.2. Análises	67
2.2.1. Variáveis bioquímicas e hematológicas	67
2.2.2. Parâmetros Imunológicos	68
2.2.2.1. Atividade respiratória de leucócitos	68
2.2.2.2. Concentração de lisozima sérica	69
2.2.2.3. Contagem total e diferencial de leucócitos	69
2.2.2.4. Determinação de globulinas e relação A:G	69
2.3. Análise estatística	69
3.0. RESULTADOS	70
3.1. Manejo dos peixes	70
3.2. Variáveis bioquímicas e hematológicas	70
3.3. Parâmetros Imunológicos	78
3.3.1. Atividade respiratória de leucócitos e concentração de lisozima sérica	78
3.3.2. Contagem total e diferencial de leucócitos	80
3.4. Sobrevivência e sinais clínicos	83
4.0. DISCUSSÃO	84
5.0. CONCLUSÃO	94
6.0. REFERÊNCIAS	94

RESUMO GERAL

A saponina de quilaia (SQ) está presente na casca de árvores chilenas e brasileiras da mesma família, Rosaceae e, de acordo com relatos, melhora o desempenho zootécnico e atua no sistema imune de aves, ratos, camarões e peixes. Assim sendo, este estudo objetivou avaliar os efeitos da inclusão de níveis crescentes de extrato purificado de SQ (0,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0 mg kg⁻¹) para juvenis de pacu. O estudo teve três etapas experimentais distintas, compostas por períodos de consumo da dieta por sete, 15 e 30 dias. Em cada etapa, foram utilizados 350 peixes, totalizando 1050 peixes. Esses foram distribuídos em 25 aquários (200L), num delineamento inteiramente casualizado. No segundo capítulo, os peixes foram anestesiados para a coleta de sangue e órgãos (fígado e intestino). Os parâmetros avaliados foram desempenho (ganho de peso, conversão alimentar e consumo de ração), sobrevivência, parâmetros fisiológicos e histológicos [glicose, cortisol, proteína total, colesterol, triglicerídeos, índice hepatossomático (IHS) e histologia de intestino]. Houve alteração no perfil de lipídios circulantes, com redução do IHS aos 30 dias e das concentrações séricas de triglicerídeos aos sete dias de consumo de SQ, respectivamente. Com 15 dias, foram observados sinais de inflamação no intestino do pacu. Não houve mortalidade durante o período de alimentação dos peixes. No terceiro capítulo, após o período de alimentação, cerca de 325 peixes foram inoculados com a bactéria *Aeromonas hydrophila* e transferidos para outro sistema experimental, sendo distribuídos em 25 aquários (160L), onde foram observados durante seis dias, quanto aos sinais clínicos da doença e ocorrência de mortalidade. Os peixes foram anestesiados para a coleta de sangue antes e após o desafio bacteriano. As análises fisiológicas foram de glicose, proteína total, albumina e globulina. As variáveis imunológicas medidas foram concentração de lisozima sérica, atividade respiratória de leucócitos (ARL), contagem total e diferencial de leucócitos e relação albumina:globulina (A:G). A porcentagem de hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e os índices hematimétricos do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) compuseram a análise hematológica. Foi avaliada ainda a sobrevivência após desafio pela *Aeromonas hydrophila*. A sobrevivência do pacu frente a infecção experimental com *Aeromonas hydrophila*

foi maior apenas após o consumo de 200 mg kg⁻¹ de SQ aos sete dias. Os efeitos estimulantes observados foram: aumento da ARL com sete dias de alimentação de 100 e 200 mg kg⁻¹ de SQ e na concentração de lisozima com 15 dias nas mesmas concentrações de SQ, independente do desafio com *Aeromonas hydrophila*. Em relação ao número de células sanguíneas, o número de trombócitos aumentou e diminuiu antes e após o desafio bacteriano, respectivamente, nos peixes que receberam 400 mg kg⁻¹ de SQ com 15 e 30 dias de alimentação. Os demais resultados mostram que a SQ, nas concentrações e tempos de administração testados, não interferiu nas respostas imunes inatas dos juvenis de pacu avaliadas frente a infecção experimental, nem nos parâmetros hematológicos. Portanto, novos protocolos de administração da saponina de quilaia devem ser realizados a fim de determinar o melhor tempo e dose sobre os efeitos desta substância na modulação do sistema imune em peixes nativos.

Palavras chave: desafio, extrato purificado, imunidade não específica, índice hepatossomático, *Piaractus mesopotamicus*, triglicerídeos.

ABSTRACT

The quillaja saponin (QS) is present in the bark of Chilean and Brazilian trees of the same family, Rosaceae and, it's able to promote performance and the immune system of animals. Thus, this study evaluated the effect of consuming diets containing increasing levels of QS (0,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0 mg kg⁻¹) by pacu. Three distinct steps in different consumption diets periods compound by seven, 15, and 30 days. At each step, was used a total of 350 fish, totaling 1050 fishes. These fishes were distributed into 25 cages (200L), in a completely randomized design. In the second chapter, after the feeding period (seven, 15 and 30 days), fish were anesthetized to blood collect and organs for physiological, histological and performance evaluation. The parameters evaluated were the performance (weight gain, apparent feed conversion and feed intake), survival, physiological and histological parameters [hepatosomatic index (HSI), blood cortisol, glucose, cholesterol, triglycerides and intestine histology]. The addition of

all levels of QS in the diets of juvenile pacu reduced the triglycerides levels at seven days and HSI at 30 days of feeding. At 15 days of feeding QS diets were observed signals intestinal inflammation in pacu. There was no mortality during the experimental period. In the third chapter, after the feeding period (seven, 15 and 30 days), about 325 fishes were inoculated with the *Aeromonas hydrophila* and transferred to another experimental system, divided into 25 cages (160L) and during six days were observed clinical signs of disease and occurrence of mortality. The fishes were anesthetized for blood collection before and after bacterial challenge. The physiological analyzes were glucose, total protein and albumin. The immunological variables measured were activity serum lysozyme, leukocytes respiratory activity (LRA), differential and leukocyte count and globulin and albumin:globulin index (A:G). Hematócrito, hemoglobin, RBC and hematimetric index of mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) compound hematological analysis. The survival of all samples was account after challenge by *Aeromonas hydrophila*. At seven days, the survival of pacu against experimental infection was higher after consumption 200 mg kg^{-1} QS. The stimulant effects observed: increased the LRA after seven days of 100 and 200 mg kg^{-1} QS feeding and concentration of lysozyme on 15 days in the same QS concentrations, independent of challenge with *Aeromonas hydrophila*. With regard to number of blood cells after bacterial challenge, the thrombocytes number increased and decline before and after bacterial challenge, respectively in fishes who received 400 mg kg^{-1} QS at 15 and 30 days of feeding. The results show that QS concentrations and times of administration tested did not interfere with the innate immune responses pacu against experimental infection with *Aeromonas hydrophila*, neither hematologic parameter. Therefore, new protocols for administration of QS should be conducted to determine the optimal time and dose on the effects of this substance in the modulation of the immune system in native fishes.

Key words: challenge, hepatosomatic index, nonspecific immunity, *Piaractus mesopotamicus*, purified extract, triglycerides.

CAPÍTULO – I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O desenvolvimento da aquicultura mundial exige o aperfeiçoamento de tecnologias empregadas à indústria de rações, à produção e manejo aquícolas. A intensificação da produção e o manejo favoreceram a incidência de doenças nos plantéis aquícolas, com consequente prejuízo no desenvolvimento dos peixes, que desviam suas reservas energéticas para seu restabelecimento e manutenção, aumentando os custos de produção e diminuindo a lucratividade do setor (Burrells et al., 2001; Barton, 2002; Urbinati & Carneiro, 2004).

Pesquisas vêm cada vez mais desenvolvendo técnicas profiláticas para peixes, principalmente por meio da alimentação e inclusão de suplementos funcionais nas rações. Suplementos naturais não convencionais estão sendo estudados e muitos foram incluídos com êxito na dieta dos peixes, como, por exemplo, *Astragalus membranaceus* e *Lonicera japonica* (Ardó et al., 2008), *Eclipta Alba* (Christyapita et al., 2007), *Radix astragalus* seu *Hedysari* e *Radix angelicae Sinensis* (Jian & Wu, 2004), *Allium sativum* (Lee & Gao, 2012), *Astragalus radix* e *Scutellaria radix* (Yin et al., 2006), entre outras. Muitos destes suplementos de origem vegetal apresentam menor custo por existir em maior abundância e por isso são atrativos para a indústria de ração. Entretanto, a adição dessas substâncias pode proporcionar efeitos adversos, pois muitos apresentam fatores antinutricionais que podem ocasionar redução do desempenho dos animais diversos tais como redução da utilização e digestão de proteína, utilização de minerais, indisponibilização de vitaminas, entre outros (Francis et al., 2001a).

A saponina de quilaia (SQ) é um suplemento natural com potencial de inclusão em dietas para peixes. Seu uso na forma purificada diminui a possibilidade de sua interação com demais substâncias antinutricionais e/ou nutrientes presentes nos alimentos de origem vegetal. Ela está listada na literatura como alimento imunoestimulante e promotor do desempenho zootécnico de peixes (Sakai, 1999; Francis et al., 2005).

1.0. Manejo na piscicultura e resposta ao estresse

O manejo na piscicultura é uma prática considerada estressante e depende da origem ou fonte, percepção ou duração e, dependendo das suas características pode interferir na fisiologia dos peixes podendo debilitá-los, conforme a intensidade (Tort, 2011). Entre as diversas práticas de manejo, há aquelas que são consideradas mais estressantes, como por exemplo, a captura dos peixes, com consequente perseguição, exposição aérea e lesões na superfície corporal (Arends et al., 1999; Hoshiba et al., 2009), o transporte de animais vivos (Urbinati et al., 2004; Fagundes & Urbinati, 2008), o adensamento na estocagem e a deterioração da qualidade da água de cultivo (Rocha et al., 2004; Santos et al., 2010; Herrera et al., 2012), entre outros.

As condições estressantes desencadeadas por estes tipos de manejo provocam diversas respostas no organismo dos peixes. O estresse pode ser definido, de acordo com Barton & Iwama (1991), como aquele que representa uma reação a um estímulo e esta resposta pode de alguma forma alterar o estado homeostático do peixe. Reddy & Leatherland (1998) completam definindo o estresse como estágio ou condição na qual a homeostase do animal é alterada. Este estado é resultante da ação externa de um agente estressor e está significativamente envolvido na manutenção da saúde ou no desenvolvimento da doença.

A reação de alarme é a resposta primária ao estresse, geralmente caracterizada por uma rápida resposta fisiológica. São ativadas pelos centros cerebrais, resultando numa maciça liberação de catecolaminas e corticosteroides e esta é seguida por um segundo estágio de resistência. Durante a resposta secundária, o organismo se adapta ou compensa as condições alteradas a fim de recuperar a homeostase, sendo definida por múltiplas ações e efeitos desses hormônios no sangue e tecido, incluindo o aumento do débito cardíaco, consumo de oxigênio e mobilização de substratos energéticos e distúrbio do balanço hidromineral. Se o estresse é excessivamente severo ou duradouro, a compensação pode não ser possível e o organismo entra no estágio final de exaustão. Esta é a resposta terciária, de natureza crônica, onde acarreta ao animal a inibição do crescimento, da reprodução, da resposta imune e reduzida

tolerância a subsequentes agentes estressores. Doenças e mortalidade em peixes, que passaram por condições estressantes, podem estar associadas a esta fase (Barton & Iwama, 1991, Wendelaar Bonga, 1997; Tort, 2011).

É importante reconhecer que a resposta de estresse em peixes envolve adaptação de todos os níveis de organização celular (Pickering & Pottinger, 1995). Estes ajustes iniciais em peixes, quando em estresse agudo, são caracterizados com um rápido aumento na ventilação opercular, fluxo sanguíneo branquial, trocas gasosas e níveis de glicose sanguíneos (Wendelaar Bonga, 1997). O estresse físico agudo pode afetar negativamente os peixes, podendo reduzir cerca de um quarto a energia disponível para demais atividades (Barton & Schreck, 1987). O confinamento de tilápias por duas horas provoca diminuição do glicogênio hepático e aumento da glicose plasmática como consequência do aumento da glicogenólise, provavelmente mediada pelas catecolaminas (Vijayan et al., 1997). O rápido aumento no nível de catecolaminas geralmente é uma resposta imediata para qualquer estressor agudo e severo (Wendelaar Bonga, 1997) e os corticosteroides provavelmente não estão envolvidos diretamente nesta resposta inicial (Barton et al., 1987).

A alteração das variáveis hematológicas são características de resposta secundária de estresse. Segundo Wedemeyer (1996), as determinações hematológicas são importante ferramenta para identificar a tolerância do peixe ao fator estressante. A aclimação do peixe à temperatura aumenta a demanda por oxigênio em salmonídeos e é acompanhada pela eritropoiese e aumento na concentração de hemoglobina sanguínea. Mudanças na contagem de eritrócitos, valores de hematócrito e hemoglobina, após estresse agudo, podem indicar uma condição de hemodiluição ou hemoconcentração (Wedemeyer, 1996). No entanto, a mensuração de características hematológicas, como as da série vermelha, se torna variável importante para se medir a atividade dos órgãos hematopoiéticos e a higidez do animal, em comparação com os parâmetros basais da espécie (Tavares-Dias & Sandrim, 1998; Tavares-Dias et al., 2009).

A resposta terciária envolve a exaustão da capacidade adaptativa dos peixes frente a uma condição desfavorável. A diminuição da capacidade reprodutiva, do crescimento e da resistência aos patógenos são as principais características

observadas após a introdução do agente estressante. Situações estas são causadas pelo estresse crônico (Wedemeyer, 1996; Tort, 2011). O estresse causado pelo adensamento populacional de truta arco-íris durante cinco meses e consequentemente deterioração da qualidade da água desencadeou aumento da mortalidade (2% ao mês) em relação ao grupo controle (0,5% ao mês). Os peixes também apresentaram menor peso ao final do experimento e a supressão do crescimento foi acompanhada pela redução do fator de condição (Pickering et al., 1991).

2.0. Sistema imune em peixes

O sistema imune é formado pela organização de células e moléculas com papel especializado em defender o organismo contra as infecções. São constituídos pela imunidade inata (não específica), a qual é responsável por proteger inicialmente o organismo contra as infecções, e pela imunidade específica (adaptativa), que é desenvolvida mais lentamente e intervém mais tarde no foco da infecção (Abbas & Lichtman, 2004). A resposta imune específica frequentemente utiliza as células e moléculas do sistema imune inato para eliminar os micro-organismos, e as funções da imunidade específica aumentam significativamente este mecanismo de defesa da imunidade inata, ou seja, uma complementa a outra no processo de defesa imune (Fernandez et al., 2002; Abbas & Lichtman, 2004).

O termo imunidade inata refere-se ao fato deste tipo de defesa estar sempre presente em organismos saudáveis, preparado para bloquear a entrada de micro-organismos, reconhecer estruturas que não estão presentes nas células do hospedeiro e eliminá-las assim que são encontradas nos tecidos. O epitélio, células de defesa presentes na circulação e tecidos, e proteínas plasmáticas constituem o sistema inato (Abbas & Lichtman, 2004). As células de defesa são representadas pelas células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células que liberam mediadores inflamatórios (basófilos, mastócitos e eosinófilos) e as células conhecidas como “natural killer” (classe de linfócitos), importantes no combate a infecções virais e células tumorais. Os componentes moleculares de

respostas inatas incluem a ativação do sistema complemento, lisozimas, proteínas de fase aguda (proteína C-reativa, proteína sérica amilóide A, inibidores de proteinase e proteínas de coagulação), citocinas, vários receptores celulares que estimulam as células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) (Lo et al., 1999; Delves & Roitt, 2000a; Biller-Takahashi & Urbinati, 2014).

No entanto, a imunidade específica também é mediada por células e componentes humorais responsáveis pela defesa contra substâncias exógenas, como micro-organismos, toxinas e células malignas, extracelulares e intercelulares. É o tipo de defesa que é estimulada pelos agentes patogênicos que invadem os tecidos e observada após uma segunda exposição deste agente invasor. Esta resposta adaptativa do sistema imune requer a presença de um antígeno (molécula estranha ou célula que irá iniciar reações e culminar no aumento de anticorpos específicos) como desencadeador do mecanismo de defesa. O mecanismo de defesa envolve a proliferação de células B e T antígeno-específicas, que decorre da ligação do antígeno aos receptores de superfície dessas células. As células especializadas, chamadas células apresentadoras de antígeno, expõem o antígeno aos linfócitos e colaboram com os mesmos na resposta ao antígeno, iniciando a resposta adaptativa para a produção de anticorpos (Delves & Roitt, 2000a; Delves & Roitt, 2000b; Abbas & Lichtman, 2004; Biller-Takahashi & Urbinati, 2014).

A regulação da hematopoiese envolve diversos mecanismos de interações celulares e não celulares, inclusive as citocinas que podem modular o desenvolvimento hematopoiético (Hanington et al., 2009). Portanto, a avaliação de parâmetros hematológicos é considerada indicadora auxiliar da resposta de estresse, condição física e podem ser utilizados na avaliação da imunidade e do estado de saúde dos peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004; Aly & Mohamed, 2010). A diminuição da quantidade de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina foram associadas ao consumo de extratos de ervas (*Azadirachta indica*, *Oscimum sanctum* and *Curcuma longa*) após a infecção por *Aeromonas hydrophila* em *Carassius auratus* (Harikrishnan et al., 2010). Entretanto, a queda desses parâmetros possui mais relação com a doença do que com o consumo de

produtos naturais (Rehulka, 2002). Tilápias que consumiram alho (*Allium sativum*) e *Echinacea purpurea* separadamente apresentaram maiores valores de hematócrito em comparação ao grupo controle (Aly & Mohamed, 2010). A concentração de hemoglobina e eritrócito de carpas (*Cyprinus carpio*) infectadas com *Aeromonas hydrophila* também aumentou a partir do 30º dia após o banho com extrato de folhas da planta *Azadirachta indica* (Harikrishnan et al., 2003).

A proteína total e suas frações também são importantes na avaliação da condição de saúde dos animais por estas atuarem na regulação da resposta inflamatória e resistência à infecção. Alterações na concentração de proteína total podem ser resultado de variações na albumina, globulinas, ou ambas. O aumento da síntese de algumas proteínas é visto em casos de estresse e inflamação, onde ocorre aumento na produção de globulinas (frações α e β) que migram como resposta da fase aguda. O desbalanço na produção de uma proteína pode ser em compensação à outra e, por esta razão é conveniente determinar a relação albumina:globulina. Esta relação pode identificar anormalidades na concentração da proteína total, como na resposta de fase aguda, no qual o aumento de globulinas está associado com a diminuição da concentração de albumina (Kratz et al., 2002). Garcia et al. (2007) e Garcia & Moraes (2009) observaram a diminuição da produção de proteína total e globulinas em peixes infectados por *Aeromonas hydrophila*, enquanto Dügenci et al. (2003) relataram o aumento na produção de proteína total em truta arco-íris que consumiram diversos extratos vegetais como imunoestimulante.

O sistema imune não específico também age independente da exposição prévia a qualquer organismo em particular. Este emprega receptores de reconhecimento padrão (RRP) que reconhecem e se ligam a padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP em inglês), tais como lipopolisacarídeos (LPS), peptidoglicanos, a lectina, a proteína C-reativa, receptor de manose e β -1,3-glucanos. Seguindo o reconhecimento dos PAMP's pelos RRP's, os receptores Toll-like iniciam o sinal de tradução intracelular que resultam na expressão de genes envolvidos na inflamação, resposta antiviral e maturação de células dendríticas (Whyte, 2007). Por isso, muitos imunoestimulantes com este tipo de estrutura, atuam ativando as células fagocíticas e consequentemente a atividade

respiratória de leucócitos (Sepulcre et al., 2007; Lin et al., 2011; Boltaña et al., 2011; Rieger, 2011).

Dietas contendo substâncias imunoestimulantes aumentam os parâmetros do sistema imune não específico, pelo aumento dos mecanismos de defesa do organismo, auxiliando na profilaxia de doenças em peixes. Estas variáveis são mensuradas por meio do aumento da atividade respiratória de leucócitos, número de células de defesa, produção de proteína total entre outras variáveis (Siwicki et al., 1994; Jian & Wu, 2004; Selvaraj et al., 2005; Yin et al., 2006; Christyapita et al., 2007; Ardó et al., 2008; Lee & Gao, 2012).

2.1. Imunoestimulantes

De acordo com Bricknell & Dalmo (2005), imunoestimulante é um composto que ocorre naturalmente e que modula o sistema imune, aumentando a resistência do hospedeiro contra doenças que na maioria dos casos são provocadas por agentes patogênicos. Sakai (1999) afirma que essas substâncias aumentam a resistência às doenças infecciosas pelo aumento dos mecanismos de defesa não específicos e podem ser divididas em vários grupos dependendo de suas fontes.

Alguns imunoestimulantes são compostos por componentes químicos existentes na composição estrutural de plantas, bactérias, colônias de fungos e leveduras. Outros são provenientes de vitaminas e minerais. Diversos grupos de substâncias promovem efeitos imunoestimulantes em animais terrestres, mas apenas alguns se mostraram eficazes para peixes (Sakai, 1999). Dentre estes, se destacam a parede celular de leveduras, que incluem principalmente glucanos e mananoligossacarídeos, saponinas provindas de diversas plantas, *Aloe vera*, vitaminas do complexo B, Vit C e E (Engstad e Robertsen, 1993; Sakai, 1999; Belo et al., 2005; Kensil, 2006; Garcia et al., 2007; Zanuzzo et al., 2012). Entretanto, as respostas do sistema imunológico a estas substâncias dependem do tipo de exposição, via oral, banho ou vacinal, de outros fatores como tempo, dosagem, método de administração e condições fisiológicas do peixe (Yoshida et al., 1995; Sakai, 1999; Sado et al., 2010). No entanto, para que o efeito do

imunoestimulante seja observado, Anderson (1992) indica que a administração do mesmo seja próxima ao tempo que antecede a exposição ao patógeno ou estresse. Isso faz com que as células responsáveis pela defesa do organismo sejam recrutadas antes da ação do agente agressor.

A identificação de algumas substâncias que podem influenciar o mecanismo não específico de defesa nos animais tem é bastante estudada nos dias atuais. Reconhece-se uma substância imunoestimulante quando esta aumenta a atividade do sistema imune ao interagir diretamente entre as células do sistema. São substâncias que possuem modo de ação independente, ou seja, cada imunoestimulante age de maneira restrita em cada célula alvo, como por exemplo, em células fagocíticas onde desencadeiam outras respostas celulares que ativam as atividades bactericidas. Muitas destas substâncias estimulam também a atividade das células natural killer, sistema complemento, lisozima e respostas de anticorpos dos peixes. A ativação destas funções imunológicas está associada com o aumento da proteção contra as doenças infecciosas (Sakai, 1999).

O interesse pelo uso de imunoestimulantes na aquicultura vem aumentando intensamente e estes são usados para diminuir os efeitos secundários causados pelo estresse ligado às condições intensivas de produção. A susceptibilidade dos peixes às doenças, segundo Burrells et al. (2001), deriva da imunossupressão induzida pelo estresse físico associado com o manejo, vacinação, classificação, mudança de tanque-rede, banhos de tratamento, etc.; tanto quanto a pressão relacionada com outros eventos naturais como mudanças do meio ambiente e conflitos sociais. Em consequência, ocorrem perdas econômicas consideráveis nestes sistemas, favorecendo dessa forma, a inclusão de imunoestimulantes como alternativa de profilaxia nos sistemas de cultivo (Selvaraj et al., 2005).

2.2. Saponina

As plantas produzem uma grande variedade de glicosídeos de alto peso molecular, conhecidos como saponinas, e estes estão presentes em diferentes fontes vegetais. A saponina possui propriedade tipo detergente, incluindo a formação de espuma estável e atividade hemolítica. Por esta razão, o termo

saponina é derivado do latim *sapo* = sabão. Em geral, a saponina consiste em um glicosídeo, ou glicosídeos, ligados a um aglicone (um esteróide ou triterpeno), possuindo diferentes propriedades farmacológicas e biológicas, que incluem atividades antifúngicas, bactericidas, antivirais e antitumorais, dependendo da estrutura específica (Kensil, 2006). Caracterizam-se pelo sabor amargo, capacidade de formar espuma em soluções aquosas, provocar hemólise e, ainda, de complexarem-se em esteróides. Quando adicionado à água em grande quantidade, é altamente tóxica aos peixes devido aos danos causados no epitélio respiratório das brânquias pela redução da tensão superficial da água (Francis et al., 2001a).

A saponina faz parte de um grupo composto por substâncias que possuem propriedades comuns; é heterogêneo quanto às suas composições químicas; são facilmente separadas das plantas por etanol ou água quente; e, sob hidrólise, produzem esteróides (C_{27}), triterpenóides (C_{30}) (Figura 1) e açúcares (hexoses, pentoses e ácidos sacáricos) (Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007).

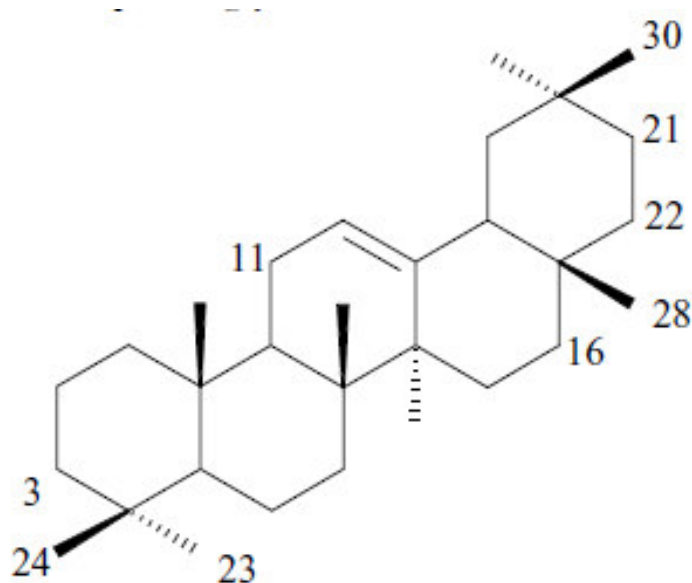


Figura 1 – Estrutura química comum da saponina triterpenóide (Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007).

A saponina triterpenóide é detectada em muitos legumes como a soja, alfafa, feijão, ervilha, etc. e também em outros gêneros como espinafre, açúcar de beterraba, quinoa, alcaçuz, girassol, castanha-da-índia e quilaia. A saponina esteróide é encontrada em aveia, pimenta-da-guiné, berinjela, semente de tomate, aspargos, inhame, fenacho, ginseng. Estes compostos têm sido bastante estudados quanto à atividade hemolítica, terapêutica (complexação com o colesterol, ativação das suprarrenais) e industrial (estabilizante e sabor); mas o aspecto nutricional de sua presença nos alimentos é pouco conhecido e os estudos concentram-se mais na soja e na alfafa (Durigan, 1994; Francis, 2001c; Rajput et al., 2007).

Altos níveis de saponinas presentes em rações foram associados a efeitos negativos no desempenho de pintos (Chubb, 1982). Porém, efeitos benéficos no desempenho de porcas e leitões foram associados ao aumento da permeabilidade intestinal apresentada pelo consumo da SQ (Hauptli & Lovatto, 2006). O aumento da digestão e absorção está relacionado a modificação na permeabilidade da mucosa intestinal, inibindo o transporte de alguns nutrientes e facilitando a absorção de outros compostos. Os efeitos negativos do consumo de saponina podem estar associados a alta concentração da saponina na dieta e ao seu gosto amargo (Durigan, 1994; Cheeke, 2000).

Ratos que consumiram 1% de SQ na dieta, durante seis meses, apresentaram uma redução benéfica dos níveis de triglicerídeos e colesterol sérico (Malinow et al., 1981). Fenwick et al. (1991) afirmam que a saponina de alfafa pode estar relacionada à alteração do metabolismo do colesterol por interferir na circulação do sal biliar. Essas características tornam esta substância interessante para o consumo animal e humano.

Entretanto, há ainda alguns ingredientes de origem vegetal que possuem em sua composição saponina e que podem causar intoxicação pelo processamento inadequado ou pela presença de outras substâncias antinutricionais, lesando órgãos. Em truta arco-íris, o consumo de soja provocou mudanças morfológicas no intestino distal, como altura ligeiramente menor da dobra simples e menos vacuolização enterócitos (Sorensen et al., 2011). Bureau et al (1998) relataram alta incidência de anormalidades na morfologia do epitélio intestinal de 'rainbow

trout' (*Oncorhynchus mykiss*) e 'chinook salmon' (*Oncorhynchus tshawytscha*) após o consumo de dietas contendo farelo de soja e SQ. Lesões hepáticas também podem ocorrer (Oakenfull, 1981), entretanto, segundo Makkar et al. (2007) não há relatos observados de anormalidades no fígado, rim ou tecido intestinal de tilápias que consumiram 700 ppm de SQ na dieta.

2.3. Quilaia (*Quillaja saponaria* Molina)

A *Quillaja saponaria* é uma árvore da família Rosaceae, nativa da região dos Andes. Sua casca apresenta mais de 10% do peso em quantidade de saponinas. A Quillaja é derivada de uma palavra chilena “*quillean*” que significa *lavar*, e denominada *saponaria* por causa das propriedades ligadas ao sabão dos extratos dessa casca (Kensil, 2006). Esta árvore é perene e cresce cerca de 30 a 40 m de altura e é encontrada na costa central do Chile, a altitude superior a 4800m nas montanhas. No sul do Brasil, pode-se encontrar a *Quillaja brasiliensis*, da mesma família da Quillaja chilena e considerada como sua potencial substituta. A árvore nativa do sul do Brasil possui saponinas com características semelhantes às da SQ chilena (Fleck, 2007).

A casca de quilaia é fonte de saponina comercial e é usada como agente formador de espumas em bebidas, confeitaria, assados, sobremesas lácteas. Possui também propriedade adicional de diminuir o colesterol no plasma sanguíneo (Hostettmann & Marston, 1995). A superfície externa desta casca é áspera, de cor escura e muito resistente. A superfície interna é lisa e branca ou branca amarelada e não possui odor. Esta casca, no seu país de origem, é utilizada para lavar roupas, remover manchas de graxa, limpeza de rendas delicadas, roupas e lã. A espuma formada da infusão aquosa da casca de quilaia é obtida devido a presença de saponina. O pó da saponina apresenta baixa toxicidade, é insípido, amorfo, branco, e pode causar espirros (Hostettmann & Marston, 1995; Felter & Lloyd, 1898). É facilmente solúvel em água, insolúvel em éter e em álcool puro. O pó da casca de quilaia, internamente, age tornando a expectoração fácil, não produzindo efeitos irritantes ao trato gastrointestinal (Felter & Lloyd, 2010).

A saponina proveniente desta planta está sendo bastante utilizada por seus efeitos benéficos tanto ao ser humano quanto aos animais. As várias aplicações vão desde aditivos na indústria de cosméticos, como complexos imunoestimulantes em vacinas, crescimento e assimilação de nutrientes pelos animais, entre outros (Hostettmann & Marston, 1995; Francis et al., 2002c). O uso mais comum da SQ é como adjuvante (ou imunopotenciador) em vacinas injetadas e orais. Neste caso, a SQ aumenta a efetividade das vacinas pela alteração da permeabilidade da mucosa intestinal (Ninomiya et al., 1995, Cheeke, 2000). Johnson et al. (1986) propuseram que algumas saponinas reagem com o colesterol das membranas do microvilo, causando lesões estruturais, proporcionando o aumento da permeabilidade dos enterócitos, facilitando a absorção de substâncias que normalmente não seriam absorvidas.

Behboudi et al. (1996 e 1997) estudaram os efeitos de uma mistura de triterpenos a partir de *Quillaja saponaria* (Iscom – complexo imunoestimulatório) como adjuvante de vacinas sobre a produção de interleucina-1 e interleucina-6, bem como seu papel na ativação de células apresentadoras de antígenos (CPA), um pré-requisito para o desenvolvimento da resposta imune. Estes Iscom's, que são estruturas formadas por saponinas triterpenóides extraída da casca da árvore da *Quillaja saponaria* Molina, mais colesterol, fosfolipídios e antígeno, proporcionaram o aumento da capacidade em ativar a CPA e consequentemente a produção de citocinas próinflamatórias, como a IL-1 e IL-6, fundamental para a estimulação da resposta das células B e T. Por outro lado, a administração oral de SQ como aditivo em rações promoveu a resistência dos animais aos desafios e às doenças sugerindo que as saponinas possuam efeitos imunoestimulatórios além de múltiplas propriedades benéficas (Cheeke, 2000). Chavalli & Campbel (1987) observaram a proliferação de linfócitos sete dias após a administração oral de SQ com antígeno da raiva (Ag + SQ) inativado em camundongos, enquanto a aplicação do antígeno apenas demorou 21 dias. No mesmo trabalho, os autores observaram que o consumo isolado de SQ aumentou a atividade das células natural killer por mais quatro semanas. Estes dados demonstram que a SQ é importante tanto na resposta imune humoral quanto na resposta imune celular.

2.4. Saponinas em peixes

As saponinas, quando adicionadas à água, são altamente tóxicas aos peixes e camarões, pois sua ação detergente causa dano no epitélio respiratório das brânquias (Chen et al., 1996; Francis et al., 2001a). Entretanto, outros autores (Francis et al., 2001b e 2002a; Serrano, 2013) não encontraram efeito negativo quando SQ foram adicionadas em dietas para peixes. O nível de 150 mg kg⁻¹ promoveu o crescimento dos peixes e maior utilização de nutrientes em carpa comum (Francis et al., 2002a). Tilápias do Nilo que consumiram 300 mg kg⁻¹ de saponina na ração por 14 semanas apresentaram taxa de crescimento 26% maior em comparação ao grupo controle. O índice hepatossomático e o intestino-somático tenderam a declinar conforme o aumento de saponina na dieta e os grupos que receberam saponina demonstraram menor excreção e maior assimilação da energia presente na ração, o que indicou o uso mais eficiente do alimento que o grupo controle (Francis et al., 2001b). Serrano (2013) observou que o consumo de SQ por carpas propiciou o aumento no ganho de peso, da taxa de crescimento específico, de eficiência proteica e de ganho proteico. Em revisão sobre as saponinas, Francis et al. (2005) afirmaram que a SQ age como promotor de crescimento natural e que pode ser vastamente utilizado na aquicultura, pois reduz a taxa metabólica e promove o crescimento de peixes como a carpa e a tilápia.

O mecanismo de ação das saponinas que contribui para a promoção do crescimento ainda não está totalmente elucidado. Um dos efeitos observado em animais que consomem a saponina é o aumento da permeabilidade da membrana intestinal aos nutrientes da dieta (Cheeke, 2000; Francis et al., 2002b; Hauptli & Lovatto, 2006). Segundo Francis & Becker (2007), a SQ na dieta aumenta significativamente a atividade das enzimas intestinais da carpa, amilase e tripsina, e enzimas do fígado, lactato desidrogenase (LDH) e citocromo c-oxidase (CO). A SQ promove a eficiência alimentar e a utilização do nutriente da dieta pelo fato de estimular a digestão de proteínas e carboidratos no intestino.

Além do efeito no desempenho animal, a SQ foi investigada quanto a atividade estimulante na absorção de antibióticos e peptídeos via nasal e ocular, larvicida, como agente moluscida, atividade antiviral e adjuvante em vacinas

(Apers et al., 2001; Santiago et al., 2005, Kensil, 2006; Roner et al., 2007), sendo essa última a mais pesquisada. Essas saponinas também possuem a capacidade de estimular a resposta imune humoral de outros animais (Chavali et al. 1987; Chavali & Campbell, 1987; Gebara et al., 1995).

Entretanto, para garantir ação eficaz do imunoestimulante é necessário o conhecimento sobre sua ação específica, o tipo de tratamento, a concentração administrada e o tempo de tratamento dos animais. A SQ pode ser administrada por imersão do peixe em ambiente contendo a substância diluída, por injeção na cavidade celomática ou pela incorporação da substância na ração, sendo esta última alternativa de aplicação bastante eficaz e adequada para a piscicultura. Camarões (*Litopenaeus vannamei*) imersos em água do mar contendo saponina de quilaia diluída apresentaram aumento da resposta do sistema imune não específico e da sobrevivência contra *Vibrio alginolyticus* (Su & Chen, 2008).

A suplementação de levedura, β -glucano, EF203, lactoferrina, levamisol e quitosana como imunoestimulantes em rações, é extensamente relatada pela literatura. Este método não é agressivo e permite a administração em massa independente do tamanho do peixe (Sakai, 1999). A administração oral de SQ pode estimular a resposta imune não específica de peixes. O consumo de SQ por yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) estimulou a migração de leucócitos, demonstrando assim considerada função nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Ninomiya et al., 1995).

A inclusão de substâncias com propriedades imunoestimulantes na ração pode ser uma estratégia para compensar a imunossupressão, conferindo ao animal melhor condição fisiológica para suportar o estresse.

2.5. *Aeromonas hydrophila*

O aparecimento de doenças na aquicultura é um dos fatores limitantes presente principalmente nos sistemas intensivos. A grande maioria dessas doenças é causada por ectoparasitas, fungos e bactérias, entretanto as de origem

viral e bacteriana são as responsáveis pelas perdas mais significativas nesta atividade comercial (Ostrensky et al., 2007).

Nos sistemas intensivos de criação, o aparecimento de diversos patógenos está diretamente relacionado à condição de estresse a qual os peixes estão expostos. Desta forma, inúmeras doenças se desenvolvem principalmente por bactérias oportunistas como a *Aeromonas hydrophila* (Camus et al., 1998; Belem-Costa, 2003; Daskalov, 2006). As bactérias do gênero *Aeromonas* são um dos principais agentes com potencial patogênico que causam perdas consideráveis em pisciculturas. Diversos gêneros de bactérias estão presentes naturalmente em ecossistemas aquáticos, tanto em tanques, rios e lagos, meio este que promove seu potencial patogênico quando as condições físicas e químicas do ambiente estão alteradas (Walters e Plumb, 1980; Camus et al., 1998).

O escurecimento da derme e sinais clínicos relacionados à hemorragia, anemia normocítica-hipocrômica, redução dos níveis de proteínas, globulinas plasmáticas e eosinófilos, leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, neutrofilia e monocitose foram observados em pacus infectados com *Aeromonas hydrophila* (Garcia & Moraes, 2009).

Atualmente não há vacina comercial disponível contra essa bactéria e o uso de antibióticos é a alternativa principal para controle dos surtos. Porém, o uso contínuo de antibióticos resultou no desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes, o que dificulta o controle dos patógenos (Godoy et al., 2008). A suplementação de imunoestimulantes em rações tem se mostrado promissora para prevenir estes tipos de problemas (Sakai, 1999).

2.6. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O pacu é uma espécie de clima tropical que tem vasta distribuição pelos rios da Bacia dos rios Prata, Paraná, Paraguai e Uruguai e é de grande importância na pesca e produção comercial, sendo cultivado principalmente na região Centro-Oeste e em parques aquícolas continentais (Ibama, 2007, MPA, 2011). É uma espécie que tem despertado interesse para a piscicultura pelo valor comercial,

visto que possui fácil adaptação à alimentação artificial, crescimento rápido e facilidade de obtenção de larvas através da reprodução induzida (Urbinati et al., 2010).

Na natureza, utiliza alimentos bastante diversificados, como folhas, caules, flores, frutos, sementes, insetos, moluscos e peixes, variando as fontes de nutrientes em função da sazonalidade (Urbinati et al., 2010). Segundo Silva (1985), o tipo de alimento observado no estômago do pacu do Pantanal mato-grossense demonstra que se trata de uma espécie herbívora com preferência frugívora.

O objetivo principal deste trabalho foi investigar a eficiência da suplementação de saponina de quilaia na dieta do pacu visando os parâmetros fisiológicos, imunológicos, hematológicos, histológicos, de desempenho produtivo e em infecção experimental por *Aeromonas hydrophila*.

3.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. 2004. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System – 2^a edition. **Library of Congress Cataloging-in-Publication Data**. An Imprint of Elsevier, Philadelphia, PA.

ALY, S. M. & MOHAMED, M. F. 2010. *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, pp. 31-39.

ANDERSON, D.P. 1992. Immunostimulants, Adjuvants, and Vaccine Carriers in Fish: Applications to Aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, pp. 281-307.

APERS, S.; BARONIKOVA, S.; SINDAMBIWE, JEAN-BOSCO; WITVROUW, M.; CLERCQ, E. DE; BERGHE, D.V.; MARCK, E.V., VLIETINCK, A.; PIETERS, L. 2001. Antiviral, haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: establishment of structure-activity relationships. **Planta Medica**, v. 67 (6), pp. 528 - 532.

ARDÓ, L.; YIN, G.; XU, P.; VÁRADI, L.; SZIGETI, G.; JENEY, Z.; JENEY, G. 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 275, pp. 26–33.

ARENDS, R. J.; MANCERA, J. M.; MUÑOZ, J. L.; WENDELAAR BONGA, S.E.; FLIK, G. 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. **Journal of Endocrinology**, v. 163, pp.149–157.

BARTON, B. A & IWAMA, G. K. 1991. Physiological Changes in Fish from Stress in Aquaculture with Emphasis on the Response and Effects of Corticosteroids. **Annual Reviews of Fish Diseases**, pp. 3-26.

BARTON, B. A. & SCHRECK, C. B. 1987. Metabolic Cost of Acute Physical Stress in Juvenile Steelhead. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 116 (2), pp. 257-263, 1987.

BARTON, B. A. 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, pp. 517–525.

BARTON, B. A.; SCHRECK, C. B.; BARTON, L. D. 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. **Diseases of aquatic Organisms**, v.2, pp. 173-185, 1987.

BEHBOUDI, S.; MOREIN, B.; VILLACRES-ERIKSSON, M. 1996. *In vitro* activation of antigen-presenting cells (APC) by defined composition of *Quillaja saponaria* Molina triterpenoids. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 105, pp. 26-30.

BEHBOUDI, S.; MOREIN, B.; VILLACRES-ERIKSSON, M. 1997. *In vivo* and *in vitro* Induction of IL-6 by *Quillaja saponaria* Molina Triterpenoid Formulations. **Cytokine**, v.9 (9), pp. 571-576.

BELEM-COSTA, A. 2003. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, pp.146–154.

BILLER-TAKAHASHI, J. D. & URBINATI, E. C. 2014. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. Academia Brasileira de Ciências, in press.

BOLTAÑA, S.; ROHERA, N.; GOETZB, F. W.; MACKENZIEA, S. A. 2011. PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, pp. 1195–1203.

BRICKNELL, I. & DALMO, R. A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, pp. 457-472.

BUREAU, D. P; HARRIS, A. M; YOUNG CHO, C. 1998. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 161, pp. 27-43.

BURRELLS, C.; WILLIAMS, P. D.; FORNO, P. F. 2001. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds, effects on resistance to disease in salmonids. **Aquaculture**, v. 199, pp. 159-169.

CAMUS, A. C.; DURBOROW, R. M.; HEMSTREET, W. G.; THUNE, R. L.; HAWKE, J. P. 1998. *Aeromonas* bacterial infections – Motile aeromonad septicemia. **Southern Regional Aquaculture Center**, nº 478, pp. 1-4.

CHAVALI, S. R. & CAMPBELL, J. B. 1987. Adjuvant effects of orally administered saponins on humoral and cellular immune responses in mice. **Immunobiology**, v. 174 (3), pp. 347-359.

CHAVALI, S. R.; FRANCIS, T.; CAMPBELL, J. B. 1987. An in vitro study of immunomodulatory effect some saponins. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 9 (6), pp. 675-683.

CHEEKE, P.R. 2000. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. **Journal of Animal Science**, v. 77, pp. 1-10.

CHEN, J-C.; CHEN, K-W.; CHEN, J.-M. 1996. Effects of saponin on survival, growth, molting and feeding of *Penaeus japonicus* juveniles. **Aquaculture**, v. 144, pp. 165- 175.

CHRISTYBAPITA, D.; DIVYAGNANESWARI, M.; DINAKARAN MICHAEL, R. 2007. 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, pp. 840-852.

CHUBB, L. G. 1982. Anti-nutritive factors in animal feedstuffs. *In*: HARESING, W. **Studies in agricultural and food science Butterworth's**. Recent Advances in Animal Nutrition, pp. 21-37.

DASKALOV, H. 2006. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v. 17, pp. 474–483.

DELVES, P. J. & ROITT, I. M. 2000a. The immune system: first of two parts. *In*: IAN MACKAY , M. D. & FRED S. ROSEN, M.D. (Eds.). **Advances in Immunology**. New England journal of medicine, v. 343 (1), pp. 37-49, 2000.

DELVES, P. J. & ROITT, I. M. 2000b. *The immune system: second of two parts*. *In*: IAN MACKAY , M. D. & FRED S. ROSEN, M.D. (Eds.). **Advances in Immunology**. New England journal of medicine, v. 343 (2), pp. 108-117.

DÜGENCI, K. S.; ARDA, N.; CANDAN, A. 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, pp. 99–106.

DURIGAN, J. F. 1994. Fatores antinutricionais *In*: **Fisiologia da digestão e absorção das aves** – Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, pp. 127 - 150.

ENGSTAD, R.E. & ROBERTSEN, B. 1993. Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v.17, pp. 319-330.

FAGUNDES, M. & URBINATI, E. C. 2008. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, 276, pp. 112-119.

FELTER, H. W. & LLOYD, J. U. 1898. **King's American Dispensatory**, <<http://www.henriettesherbal.com>> acessado 07 de abril de 2010.

FENWICK, G. R.; PRICE, K. R.; TSUKAMOTO, C.; OKUBO, K. 1991. Saponins. *In*: D' Mello, F. J. P.; Duffus, C. M.; Duffus, J. H. (Eds.). **Toxic substances in crop plants**. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science park, Cambridge CB4 4WF: Cambridge, pp. 285-327.

FERNANDEZ, A. B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. 2002. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. **Revista AcuaTIC**, v.16.

FLECK, J. D. 2007. Constituição química, avaliação da atividade imunoadjuvante e estudos de propagação de *Quillaja brasiliensis*. 137p. Tese (Doutora em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FRANCIS, G. & BECKER, K. 2007. Plant Saponins. *In*: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D. M. (Eds.). **Dietary supplements for the health and quality of cultured fish**. CAB International 2007. Cambridge, USA, pp. 178-192.

FRANCIS, G. 2001c. Effects of low dietary levels of saponins on two common culture fish – common carp (*Cyprinus carpio* L.) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)). Dissertation. Aus dem Institut für Tierproduktion in den Tropen und Subtropen der Universität Hohenheim Fachgebiet Aquakultur-Systeme und Tierernährung, 140 p.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. 2002c. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, pp. 587 - 605.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. 2001a. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Review. **Aquaculture**, v. 199, pp. 197–227.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. 2001b. Effects of *Quillaja* saponins on growth, metabolism, egg production and muscle cholesterol in individually reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 129, pp.105-114.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. 2002a. Dietary supplementation with a *Quillaja* saponin mixture improves growth performance and metabolic efficiency in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 203, pp. 311-320.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. 2002b. Effects of cyclic and regular feeding of a *Quillaja* saponin supplemented diet on growth and metabolism of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, pp. 343–350.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. 2005. *Quillaja* saponins - a natural growth promoter for fish. **Animal Feed Science and Technology**, v.121, pp.147-157.

GARCIA, F. & MORAES, F. R. 2009. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum**, v. 31 (1), pp. 17-21.

GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, pp. 39-46.

GEBARA, V. C. B. C.; PETRICEVICH, V. L.; RAW, I.; SILVA, W. D. 1995. Effect of saponin from *Quillaja saponaria* (Molina) on antibody, tumor necrosis factor and interferon- γ production. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 21, pp. 31-37.

GODOY, D. T.; MIAN, G. F.; ZANOLO, R.; YUHARA, T. Y.; FARIA, F. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. 2008. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilian strains of motile aeromonads. **Aquaculture**, v. 285, pp. 255–259.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAG, O. & MAZZA, G. 2007. Saponins: Properties, Applications and Processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47 (3), pp. 231-258.

HANINGTON, P. C.; TAMB, J.; KATZENBACK, B. A.; HITCHEN, S. J.; BARREDA, D. R. 2009. Development of macrophages of cyprinid fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, pp. 411–429.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAMB, C.; HEO, MOON-SOO. 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, pp. 354-361.

HARIKRISHNAN, R.; RANI, M. N.; BALASUNDARAM, C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v. 221, pp. 41–50.

HAUPTLI, L. & LOVATTO, P. A. 2006. Alimentação de porcas gestantes e lactantes com dietas contendo saponinas. **Ciência Rural – Santa Maria**, v. 36, pp. 610-616.

HERRERA, M.; RUÍZ-JARABO, I.; HACHERO, I.; VARGAS-CHACOFF, L.; AMO, A.; MANCERA, J. M. 2012. Stocking density affects growth and metabolic parameters in the brill (*Scophthalmus rhombus*). **Aquaculture International**, v. 20, pp. 1041–1052.

HOSHIBA, M. A.; GONÇALVES, F. D.; URBINATI, E. C. 2009. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. **Acta Amazônica**, v. 39(2), pp. 445-452.

HOSTETTMANN, K. & MARSTON, A. 1995. Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge University Press, pp. 544.

IBAMA, 2007. Estatística da pesca 2007 Brasil – Grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 113 p.

JIAN, J. & WU, Z. 2004. Influences of traditional chinese medicine on non-specific immunity of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.16, pp. 185–191.

JOHNSON, I. T.; GEE, J. M.; PRICE, K.; CURL, C; FENWICK, G. R. 1986. Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport *in vitro*. **The Journal of Nutrition**, v.116, pp. 2270-2277.

KENSIL, C. R., 2006. Immunomodulatory adjuvants from Quillaja saponaria. In: SCHIJNS, V.; O'HAGAN, D. (Eds.). **Immunopotentiators in modern vaccines**. Elsevier Academic Press, pp. 109-122.

KRATZ, A.; LEE-LEWANDROWSKI, E.; LEWANDROWSKI, K. B. 2002. The plasma proteins. In: McCLATCHEY, K. D. (Ed.) **Clinical Laboratory Medicine**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2nd ed., pp. 263-280.

LEE, J. Y. & GAO, Y. 2012. Review of the Application of Garlic, *Allium sativum*, in Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43 (4), pp. 447-458.

LIN, S.; PAN, Y.; LUO, L.; LUO, L. 2011. Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, pp. 788-794.

LO, D.; FENG, L.; LI, L.; CARSON, M. J.; CROWLEY, M.; PAUZA, M.; NGUYEN, A.; REILLY, C. R. 1999. Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. **Immunological Reviews**, v. 169, pp. 225-239.

MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. 2007. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **The Animal Consortium**, v. 1 (9), pp. 1371–1391.

MALINOW, M. R.; MCNULTY, W. P.; MCLAUGHLIN, P.; STAFFORD, C.; BURNS, A. K.; LIVINGSTON, A. L.; KOHLER, G.O. 1981. The toxicity of alfalfa saponins in rats. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 19, pp. 443-445.

MPA, 2011. Ministério da Pesca e Aquicultura, **Espécies cultivadas no Brasil**. <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/especies-cultivadas>> acessado 04 de março de 2014.

NINOMIYA, M.; HATTA, H.; FUJIKI, M.; KIM, M.; YAMAMOTO, T.; KUSUDA, R. 1995. Enhancement of chemotactic activity of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) leucocytes by oral administration of quillaja saponina. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, pp. 325–328.

OAKENFULL, D. 1981. Saponins in food - a review. **Food Chemistry**, v. 6, pp. 19-40.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (Eds.) 2007. Estudo Setorial para Consolidação de uma Aquicultura Sustentável no Brasil. Curitiba, 279 p.

PICKERING, A. D. & POTTINGER, T. G. 1995. Biochemical effects of stress *In*: HOCHACHKA & MOMMSEN (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of fishes**, v. 5, pp. 349-379.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G.; SUMPTER, J. P.; CARRAGHER, J. F.; LE BAIL, P. Y. 1991. Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 83, pp. 86-93.

RAJPUT, Z. I.; HU, S. H.; XIAO, C. W.; ARIJO, A. G. 2007. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. **Journal of Zhejiang University, SCIENCE B**, v. 8 (3), pp. 153-161.

REDDY, P. K. & LEATHERLAND, J. F. 1998. Stress physiology. **Fish Disease and Disorders**, v.2, pp. 279-301.

REHULKA, J. 2002. *Aeromonas* Causes Severe Skin Lesions in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Clinical Pathology, Haematology and Biochemistry. **Acta Veterinaria Brno**, v. 71, pp. 351–360.

RIEGER, A. M.; HALLC, B. E.; BARREDA, D. R. 2010. Macrophage activation differentially modulates particle binding, phagocytosis and downstream antimicrobial mechanisms. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, 1144–1159.

ROCHA, R. M., CARVALHO, E. G., URBINATI, E. C. 2004. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã, *Brycon cephalus*, (Gunther, 1869), Teleostei: Characidae. **Aquaculture Research**, v. 35, pp. 245-249.

RONER, M. R.; SPRAYBERRY, J.; SPINKS, M.; DHANJI, S. 2007 Antiviral activity obtained from aqueous extracts of the Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria* Molina). **Journal of General Virology**, v. 88, pp. 275–285.

RUST, M. B. 2002. Nutritional Physiology *In*: HALVER, E. J. & HARDY, D. M. (Eds.). **Fish Nutrition**. Academic Press, Inc. San Diego, US.

SADO, R. Y.; BICUDO, A. J. A.; CYRINO, J. E. P. 2010. Dietary Levamisole Influenced Hematological Parameters of Juvenile Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41 (S1), pp. 66-75.

SAKAI, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, pp. 63–92.

SANTIAGO, G. M. P.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D. L.; SANTOS, R. P.; POULIQUEN, Y. B. M.; ARRIAGA, A. M. C.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R. 2005. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15(3), pp. 187-190.

SANTOS G. A.; SCHRAMA, J. W.; MAMAUAG, R. E. P.; ROMBOUT, J. H. W. M.; VERRETH, J. A. J. 2010. Chronic stress impairs performance, energy

metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The combined effects of fish crowding and water quality deterioration. **Aquaculture**, v. 299, pp. 73–80.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.19, PP. 293-306.

SEPULCRE, M. P.; LÓPEZ-CASTEJÓN, G.; MESEGUER, J.; MULERO, V. 2007. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. **Molecular Immunology**, v. 44, pp. 2009–2016.

SERRANO, A. E. 2013. Effects of *Quillaja* saponins on growth, feed efficiency, digestive enzyme activities and metabolism of common carp (*Cyprinus carpio* L). **Aquaculture Nutrition**, v. 19, pp. 468–474.

SILVA, A. J. 1985. Aspectos da alimentação do pacu adulto, *Colossoma metrei* (Berge, 1895) (PISCES, CHARACIDAEA), no Pantanal do Mato Grosso. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 41, pp. 125-139.

SØRENSEN, M.; PENN, M.; EL-MOWAFI, A.; STOREBAKKEN, T.; CHUNFANG, C.; ØVERLAND, M.; KROGDAHL, Å. 2011. Effect of stachyose, raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility, digestive enzymes, gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). **Aquaculture**, v. 314, pp. 145–152.

SU, B-K. & CHEN, J-C. 2008. Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, pp. 74-81.

TAVARES-DIAS, M. & SANDRIM, E. F. S, 1998. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Acta Scientiarum**, v. 20 (2), pp. 151-155.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. 2004. **Hematologia de peixes teleósteos**. Villimpress Complexo Gráfico, 144p.

TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M. M., MARTINS, M. L., SATAKE, F.; HISANO, H.; PADUA, S. B., JERONIMO, G. T.; SANT'ANA, A. R. 2009. *In*: Hematologia: Ferramenta Para o Monitoramento do Estado de Saúde de Peixes em Cultivo. **Tópicos Especiais em Saúde e Criação Animal (1ª ed.)**. Saran-Neto; Mariano, W. S.; Pozzobon-Soria. (Org.) Pedro & João Editores, São Carlos.

TORT, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, pp. 1366–1375.

URBINATI, E. C. & CARNEIRO, P. C. F. 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. *In*: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (EDS.). **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo, TecArt, 533 p.

URBINATI, E. C.; ABREU, J. S.; CAMARGO, A. C. S.; PARRA, M. A. L. 2004. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. **Aquaculture**, v. 229 (1-4), pp. 389-400.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. 2010. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) *IN*: BALDISSEROTTO, B. & GOMES, L. C. (Org.) **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2ª edição revisada e ampliada – Santa Maria: Ed. da UFSM.

VIJAYAN, M. M.; PEREIRA, C.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 116C (1), pp. 89–95.

WALTERS, G. R. & PLUMB, J. A. 1980. Enviromental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **Journal of Fish Biology**, v.17, pp.177-185.

WEDEMEYER, G. A. 1996. Physiology of fish in intensive culture systems. Chapman & Hall, New York.

WENDELAAR BONGA, S. E. 1997. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77 (3), pp. 591-625.

WHYTE, S. K. 2007. The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, pp. 1127-1151.

YIN, G.; JENEY, G.; RACZ, T.; XU, P.; JUN, X.; JENEY, Z. 2006. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 253, pp. 39-47.

YOSHIDA, T.; KRUGER, R.; INGLIS, V. 1995. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. **Journal of Fish Diseases**, v. 18, pp. 195-198.

ZANUZZO, F. S.; BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. 2012. 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 (10), pp. 2299-2302.

CAPÍTULO – II

**Efeitos do consumo de saponina de quilaia (*Quillaja saponaria* Molina) no desempenho, indicadores fisiológicos e histológicos do
pacu**

RESUMO

Juvenis de pacu consumiram rações contendo cinco níveis de extrato purificado de saponina de quilaia (SQ) (0, 100, 200, 300 e 400 mg kg⁻¹) durante sete, 15 e 30 dias. Em cada etapa, 350 juvenis de pacu (59,7 ± 3,4 g) foram distribuídos em 25 aquários (200L), num delineamento inteiramente casualizado. Ao final de cada etapa, 25 peixes (n=5 por tratamento) foram amostrados para coleta de material biológico. Foram avaliados o desempenho (ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar aparente), a sobrevivência, variáveis fisiológicas [índice hepatossomático (IHS), cortisol, glicose, colesterol e triglicerídeos sanguíneos] e aspectos histológicos do intestino. Não houve mortalidade durante o período de alimentação. A adição de SQ nas dietas de pacu juvenil reduziu os níveis de triglicerídeos aos sete dias de alimentação e do IHS aos 30 dias, com 200, 300 e 400 mg kg⁻¹ de SQ. Aos 15 dias, foram observados sinais de inflamação intestinal nos peixes que consumiram 100, 200 e 300 mg kg⁻¹ de SQ. Os resultados deste estudo não evidenciaram efeitos em indicadores de estresse.

Palavras chave: lipídeos, *Piaractus mesopotamicus*, saponinas.

ABSTRACT

Juvenile pacu were fed diets containing five levels of purified extract of quillaja saponin (QS) (0, 100, 200, 300 and 400 mg kg⁻¹) during seven, 15, and 30 days. In these distinct periods, about 350 pacu were divided into 25 tanks (200L) in a completely randomized design. At the end of each period, a parcel of 25 fish (n=5) was separated for collection of biological sample for hematological analysis. The parameters evaluated were the performance (weight gain, feed intake and apparent feed conversion), survival, physiological variables (hepatosomatic index, blood cortisol, glucose, cholesterol and triglycerides) and histological aspects of intestine. There was no mortality during the experimental period. The addition of all levels of saponin in the diets of juvenile pacu reduced the triglycerides levels at

seven days and HSI at 30 days of feeding with 200, 300 e 400 mg kg⁻¹ SQ concentration. At 15 days, signs intestinal inflammation were observed in fishes consumed 100, 200 and 300 mg kg⁻¹ SQ. The results revealed no effects on indicators of stress.

Key Words: lipids, *Piaractus mesopotamicus*, saponins.

1.0. INTRODUÇÃO

A aquicultura brasileira está em grande ascensão nas últimas décadas. Um dos principais motivos é a grande concentração de rios e represas pelo interior do país que favorece a expansão de pisciculturas de alta qualidade e desempenho e, o incentivo de políticas públicas para o aumento da produção (Ostrensky et al., 2007). Nesse cenário, é de grande importância o desenvolvimento de tecnologias voltadas ao campo. A elaboração de rações que permitam o alto desempenho e saúde animal é importante para a criação de um pacote tecnológico das principais espécies cultivadas no país. Para isso, substâncias que auxiliam a saúde e desempenho animal têm sido testadas de forma crescente.

As rações na aquicultura representam cerca de 60% do custo de produção em sistemas intensivos e o manejo nutricional eficiente tem efeito direto sobre a rentabilidade (Serrano, 2013). A busca por rações de baixo impacto ambiental, de maior valor nutricional e funcional, permite que as espécies de peixes expressem plenamente seu potencial genético para desempenho e saúde, resultando em máxima qualidade do produto final.

As saponinas são substâncias vastamente distribuídas no reino vegetal. São compostos anfipáticos, onde açúcares (glicose, galactose, ácido glicurônico, xilose ramnose e metilpentose) são ligados ao grupo não polar (sapogenina) o qual pode ser um esterol ou um triterpeno (Francis et al., 2002; Oakenful, 1981). As saponinas consistem em uma combinação de elementos cujas estruturas,

polar e não polar, de suas moléculas justificam seu comportamento de sabão em soluções aquosas (Oakenfull, 1986; Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007).

A saponina de quilaia (SQ) (*Quillaja saponaria* Molina) possui estrutura triterpenóide e está presente na casca de árvores chilenas e brasileiras da mesma família. Esta substância possui capacidade em formar complexos insolúveis com os lipídios da dieta, influenciando na emulsificação de gorduras e na formação de micelas com sais biliares e colesterol no intestino e aumentando sua excreção (Oakenfull, 1986; Cheeke, 2000). Além do efeito na redução do colesterol total, triglicerídeos e dos lipídios, o consumo de SQ também proporciona aumento do desempenho e da imunidade em aves, ratos, cobaias, camarões e peixes (Malinow et al., 1981; Chavali & Campbell, 1987; Potter et al., 1993; Ninomiya et al., 1995; Francis et al., 2001, 2005; Cheeke, 2000, 2009).

O aumento da digestão e absorção atribuído a SQ está relacionado à modificação na permeabilidade da mucosa intestinal, inibindo o transporte de alguns nutrientes e facilitando a absorção de outros compostos. Como foi observado por Hauptli & Lovatto (2006), o consumo de SQ foi associado ao aumento da permeabilidade intestinal, favorecendo o desempenho de porcas e leitões. Em revisão sobre as saponinas, Francis et al. (2005) afirmaram que elas agem como promotores de crescimento natural e que podem ser vastamente utilizadas na aquicultura, pois reduzem a taxa metabólica e promovem o crescimento de peixes, como a carpa e a tilápia. A SQ na dieta aumentou significativamente a atividade das enzimas intestinais da carpa, amilase e tripsina, e enzimas do fígado, lactato desidrogenase (LDH) e citocromo c-oxidase (CO) (Francis & Becker, 2007; Serrano, 2013), promovendo a eficiência alimentar e a utilização do nutriente da dieta, por estimular a digestão de proteínas e carboidratos no intestino, segundo os estudos citados.

Entretanto, alguns ingredientes de origem vegetal podem causar intoxicação pelo processamento inadequado ou pela presença de substâncias antinutricionais, lesando órgãos. Em truta arco-íris, o consumo de soja provocou mudanças no intestino distal, como altura ligeiramente menor da dobra simples e menos vacuolização enterócitos (Sorensen et al., 2011). Bureau et al. (1998) relataram irregularidades na forma dos enterócitos, presença de vacúolos no

citoplasma apical de tamanho grande a muito grande entre outras alterações no epitélio intestinal de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e 'chinook salmon' (*Oncorhynchus tshawytscha*), após o consumo de dietas contendo farelo de soja e SQ.

Este estudo avaliou o uso de rações contendo níveis de inclusão de extrato purificado de SQ e seu efeito no desempenho, na sobrevivência, em indicadores fisiológicos e na morfologia do intestino de juvenis de pacu.

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Peixes Ornamentais, do Centro de Aquicultura da Unesp – Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal.

2.1. Experimento

2.1.1. Acondicionamento e manejo dos peixes

O estudo foi dividido em três etapas de sete, 15 e 30 dias. Em cada etapa, foram utilizados 350 juvenis de pacu, totalizando ao final das três etapas, 1050 peixes. Estes peixes apresentavam peso e tamanho médio inicial de $59,7 \pm 3,4$ g e $14,1 \pm 0,3$ cm, respectivamente, e foram aleatoriamente estocados em 25 caixas de 200L, na densidade de 14 peixes/caixa. A aclimação dos peixes foi feita no mesmo sistema experimental durante sete dias. Este sistema era estático e a aeração e aquecimento individual. Durante a fase de aclimação e período experimental, os animais foram alimentados até a saciedade aparente em dois períodos ao dia, às 10:00 e 16:30.

A qualidade da água foi monitorada semanalmente pela análise da concentração de oxigênio dissolvido ($5,09 \pm 0,40$ mg L⁻¹) e temperatura ($27,2 \pm 0,93$ °C) pelo medidor YSI 55 e o pH ($6,0 \pm 0,16$) pelo phmetro digital de bancada. Diariamente, os aquários experimentais foram sifonados para a retirada de sobras de dietas, acúmulo de excretas, sendo feita a renovação de 2/3 da água.

2.1.2. Dietas experimentais

Foram avaliadas dietas práticas com quatro níveis de inclusão de extrato de quilaia (Sigma S7900) e uma dieta controle, que constituíram cinco tratamentos. As dietas foram formuladas com base nas exigências nutricionais da espécie (Tabela 1), e apresentaram perfil isoenergético (4030 cal de EB g⁻¹ da dieta), isofibroso (4,0% de FB) e isoprotéico (27,9% de PB kg⁻¹). Às dietas foram adicionados 0, 100, 200, 300 e 400 mg kg⁻¹ da saponina purificada, constituindo os tratamentos. Por precaução, foi substituído o farelo de soja pelo glúten de milho por esta possuir saponina em sua composição.

Tabela 1 - Formulação das dietas e composição calculada (g)

Ingrediente (g)	TRATAMENTOS				
	Nível de inclusão de saponina de quilaia (mg kg ⁻¹)				
	0	100	200	300	400
Glúten de milho	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00
Farinha de peixe	17,11	17,11	17,11	17,11	17,11
Farinha de vísceras	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Farelo de milho	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00
Farelo de trigo	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00
Óleo de soja	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13
Amido de milho	9,87	9,87	9,87	9,87	9,87
Saponina	0,000	0,010	0,020	0,030	0,040
Lisina	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
Metionina	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Treonina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Triptofano	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Celulose	2,40	2,39	2,38	2,37	2,36
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Suplemento vitamínico e mineral ^a	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Vitamina C	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Sal comum	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
TOTAL (g)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

^a níveis de garantia kg⁻¹ (Agromix)- vitamina A: 5000 UI; vitamina D3: 2500 UI; vitamina E: 250 mg; vitamina K: 9 mg; vitamina B1: 10 mg; vitamina B2: 12 mg; pantotenato de cálcio: 30 mg; niacina: 160 mg; biotina: 0,18 mg; ácido fólico: 1,70 mg; vitamina B12: 31 mg; vitamina B6: 5 mg; Selênio: 0,30 mg; MnO: 100 mg; ZnO: 220 mg; FeSO₄, 142 mg; CuSO₄: 15 mg; CoSO₄, 0,5 mg; I₂Ca, 7,25 mg; veículo q.s.p., 1000g.

Após a pesagem, mistura e homogeneização dos ingredientes, estes receberam água a 55 °C, na proporção de 25% do peso total da mistura e foram peletizados em grânulos de 4 mm de diâmetro e desidratados em estufa de ventilação forçada a 55°C, durante 24h. Em seguida, os grânulos foram fracionados em diferentes diâmetros, para ajustarem-se ao tamanho da boca dos peixes, e armazenados a -18 °C até uso.

2.1.3. Coleta de material biológico

Ao final de cada período experimental, um peixe por aquário (n=5), em cada tratamento, foi anestesiado em solução alcoólica de benzocaína (0,1 g L⁻¹), pesado, medido e o sangue retirado por punção do vaso caudal, para as análises fisiológicas. Os peixes foram eutanasiados por aprofundamento em plano anestésico para a remoção do fígado, que foi pesado para o cálculo do índice hepatossomático e análise histológica, e intestino, para análise histológica.

Uma alíquota de sangue de cada animal foi separada em três microtubos, um para a separação do soro para análises de colesterol e triglicerídeos, outro com EDTA para separar o plasma para a determinação do cortisol e o último com Glistab (fluoreto de potássio + EDTA), para a determinação da glicose plasmática.

2.2. Análises

2.2.1. Variáveis de desempenho

Os peixes foram contados, pesados e medidos no início e ao final de cada período experimental, para determinação do ganho de peso (GP), conversão alimentar aparente (CA) e sobrevivência (SOB). Estes índices foram obtidos de acordo com as seguintes fórmulas:

$$GP = Pf - Pi$$

Onde:

GP = ganho de peso;

Pf = peso final (g);

Pi = peso inicial (g).

$$CA = \frac{CR}{GP}$$

Onde:

CA = conversão alimentar;

CR = consumo de ração;

GP = ganho de peso.

2.2.2. Variáveis fisiológicas

A concentração plasmática de cortisol foi determinada por kit (Radioimmunoassay Kit Coat-a-count cortisol – Siemens Medical Solutions Diagnostics, LA, USA), no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ, Botucatu.

Para a determinação das concentrações plasmáticas de glicose e séricas de colesterol e triglicerídeos foram utilizados os kits colorimétricos, Glicose Liquiform (ref. 133-2/500), Colesterol Liquiform (ref. 76-2/250) e Triglicerídeos Liquiform (ref. 87-2/250), da Labtest Diagnóstica, respectivamente.

O fígado foi pesado para determinação do índice hepatossomático, obtido conforme a seguinte fórmula:

$$\text{IHS} = 100 \times \frac{\text{peso do fígado}}{\text{peso vivo total}}$$

Onde:

IHS = índice hepatossomático;

Peso do fígado = peso do fígado em gramas;

Peso vivo total = peso vivo do peixe em gramas.

2.2.3. Exame histológico

Após a remoção da porção inicial do intestino de 25 peixes (n=5 por tratamento), ao final de cada período experimental, o material foi processado e todas as estruturas foram fixadas em solução de Bouin, lavadas em água corrente, desidratadas em álcool 70% e, por último, incluídas em parafina. Os cortes, com cinco micrômetros de espessura, foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Os dados morfológicos foram obtidos a partir de imagens dos cortes histológicos capturadas por meio do analisador de imagens LAS V3.6.0 LEICA CTR5000.

2.3. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância simples (ANOVA). Quando constatada diferença significativa entre as médias, aplicou-se o teste de Duncan. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS ao nível de 5,0% de significância.

3.0. RESULTADOS

3.1. Acondicionamento e manejo dos peixes

Não houve mortalidade dos peixes durante o estudo.

3.2. Variáveis de desempenho

O ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar aparente (CA) dos peixes aos 30 dias estão apresentados na Tabela 2. Os resultados referentes aos outros tempos de amostragem (sete e 15 dias) não são apresentados, pois não diferiram significativamente. Aos 30 dias também não houve efeito evidente dos tratamentos com saponina, exceto pelo CR dos peixes do tratamento 300 mg kg⁻¹ que foi menor que o CR dos peixes dos tratamentos 0 e 400 mg kg⁻¹.

Tabela 2 - Ganho de peso (GP) (g), consumo de ração (CR) (g/peixe) e conversão alimentar (CA) de pacus alimentados por 30 dias com dietas contendo níveis crescentes de SQ (n=5).

Saponina de quilaia (mg kg ⁻¹)	Variáveis		
	GP	CR	CA
0	29,58 ±24,97	63,90 ±2,43 ^a	2,79 ±1,74
100	25,50 ±11,82	59,68 ±8,26 ^{ab}	2,71 ±1,15
200	31,93 ±8,77	57,32 ±2,26 ^{ab}	1,91 ±0,55
300	19,48 ±2,06	54,61 ±4,75 ^b	2,25 ±0,19
400	40,83 ±1,32	65,80 ±8,15 ^a	1,53 ±0,19

Médias ($\mu \pm DP$) com a mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p>0,05$).

3.3. Variáveis fisiológicas

Na Tabela 3 são apresentadas as variáveis fisiológicas. Aos sete dias, a concentração de cortisol plasmático (ng mL^{-1}) foi mais alta nos peixes do tratamento 200 mg kg^{-1} , em relação aos tratamentos 0, 300 e 400 mg kg^{-1} , enquanto que, aos 15 e 30 dias, não se verificou diferença significativa entre tratamentos. Não se observa nenhum padrão na resposta observada ou efeito da SQ neste parâmetro.

A glicose plasmática foi maior nos peixes do tratamento 200 e 400 mg kg^{-1} em relação aos tratamentos 0, 100 e 300 mg kg^{-1} , aos sete dias de alimentação. Aos 15 dias, o menor valor deste indicador foi observado no tratamento 100 mg kg^{-1} , e aos 30 dias não houve diferença entre tratamentos. Comparando os tratamentos, em cada tempo de amostragem, observou-se menor glicemia aos 30 dias no grupo controle, aos 15 dias no tratamento 100 mg kg^{-1} , aos 15 e 30 dias no tratamento 200, 300 e 400 mg kg^{-1} . Os valores mais elevados foram sempre observados na primeira amostragem, aos sete dias. Não é possível observar um padrão nas respostas da glicemia, nem efeito da SQ.

Aos 15 dias de oferta das dietas, os peixes que consumiram SQ, em todos os níveis de inclusão, apresentaram concentração sérica de colesterol reduzida em relação ao grupo controle, mas não houve diferença significativa na comparação dos tratamentos nos outros tempos de alimentação.

Aos sete dias, a concentração sérica de triglicerídeos mais baixa é observada nos peixes do tratamento 100 mg kg^{-1} , em relação aos do grupo controle, enquanto nas outras concentrações de SQ os valores são intermediários. Aos 15 dias, os tratamentos não diferem entre si. Aos 30 dias, não havia material para as análises de triglicerídeos.

De acordo com a Tabela 3, que mostra o comportamento do IHS, é possível observar uma queda desse índice conforme se aumenta o tempo de oferta das dietas, exceto no tratamento 100 mg kg^{-1} , mas não se observa efeito evidente da saponina neste indicador fisiológico. Apenas aos 30 dias, o IHS dos peixes do tratamento 200, 300 e 400 mg kg^{-1} apresentou valores mais baixos.

Tabela 3 – Níveis de Cortisol (ng mL⁻¹), Glicose (mg dL⁻¹), Colesterol (mg dL⁻¹), Triglicerídeos (mg dL⁻¹) e Índice Hepatosomático (IHS) de pacus alimentados por sete, 15 e 30 dias com dietas contendo níveis crescentes de SQ nas rações (n=5).

Variáveis	Dias	Tratamento				
		Saponina de quilaia (mg kg ⁻¹)				
		0	100	200	300	400
Cortisol (ng mL ⁻¹)	7	31,04 ±9,5 ^{Bb}	45,54 ±9,8 ^{ABa}	58,54 ±27,0 ^{Aa}	26,03 ±1,8 ^{Ba}	27,56 ±14,3 ^{Ba}
	15	74,71 ±29,3 ^{Aa}	36,63 ±11,7 ^{Aa}	42,17 ±24,3 ^{Aa}	60,14 ±47,8 ^{Aa}	40,82 ±24,5 ^{Aa}
	30	34,99 ±16,1 ^{Ab}	48,36 ±21,0 ^{Aa}	61,00 ±17,2 ^{Aa}	51,02 ±5,9 ^{Aa}	28,59 ±21,6 ^{Aa}
Glicose (mg dL ⁻¹)	7	80,09 ±8,9 ^{Ba}	82,45 ±4,4 ^{Ba}	102,04 ±8,0 ^{Aa}	82,76 ±1,9 ^{Ba}	96,13 ±3,5 ^{Aa}
	15	74,60 ±6,2 ^{Aa}	63,59 ±3,0 ^{Bb}	73,92 ±9,4 ^{Ab}	72,82 ±4,3 ^{Ab}	78,71 ±5,9 ^{Ab}
	30	62,61 ±1,9 ^{Ab}	71,93 ±15,2 ^{Aab}	66,34 ±6,7 ^{Ab}	69,68 ±3,4 ^{Ab}	62,68 ±4,2 ^{Ac}
Colesterol (mg dL ⁻¹)	7	169,04 ±12,7 ^{Ab}	164,52 ±28,9 ^{Aa}	169,83 ±18,1 ^{Aa}	145,38 ±25,6 ^{Aa}	137,67 ±38,0 ^{Aa}
	15	205,76 ±4,3 ^{Aa}	156,83 ±7,5 ^{Ba}	141,01 ±29,8 ^{Ba}	166,33 ±22,1 ^{Ba}	166,62 ±19,9 ^{Ba}
	30	148,63 ±30,6 ^{Ab}	176,56 ±43,9 ^{Aa}	160,85 ±16,9 ^{Aa}	157,01 ±35,4 ^{Aa}	153,28 ±3,5 ^{Aa}
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	7	280,81 ±69,4 ^{Aa}	144,53 ±30,8 ^{Bb}	181,78 ±69,8 ^{ABb}	188,18 ±89,8 ^{ABa}	232,87 ±85,7 ^{ABa}
	15	288,11 ±85,7 ^{Aa}	279,82 ±92,4 ^{Aab}	314,36 ±17,9 ^{Aa}	278,41 ±64,1 ^{Aa}	294,98 ±43,8 ^{Aa}
IHS	7	2,22 ±0,03 ^{Aa}	2,07 ±0,28 ^{Aa}	2,31 ±0,14 ^{Aa}	2,05 ±0,29 ^{Aa}	2,23 ±0,30 ^{Aa}
	15	1,62 ±0,51 ^{Ab}	1,76 ±0,27 ^{Aa}	2,00 ±0,33 ^{Aa}	1,54 ±0,17 ^{Ab}	1,85 ±0,10 ^{Ab}
	30	1,75 ±0,05 ^{Aab}	1,73 ±0,12 ^{Aa}	1,44 ±0,04 ^{ABb}	1,37 ±0,36 ^{Bb}	1,66 ±0,03 ^{ABb}

Médias ($\mu \pm DP$) com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p>0,05$). Letras maiúsculas comparam concentrações de SQ no mesmo tempo e letras minúsculas comparam tempos em cada concentração de SQ.

3.4. Exame histológico

Observou-se na Figura 1 espessamento da lâmina própria central dentro das dobras intestinais e na base do vilo, devido ao aumento da quantidade de tecido conjuntivo, principalmente nos peixes que receberam SQ na dieta. Na Figura 2, houve aumento do número de linfócitos no interior da lâmina própria e submucosa do intestino delgado, com algumas áreas contendo infiltrado inflamatório e espessamento da camada muscular externa, principalmente no intestino dos peixes dos tratamentos contendo SQ, aos 15 dias de consumo da dieta. Observou-se o estreitamento da camada muscular externa do intestino nos peixes que consumiram 100, 300 e 400 mg kg⁻¹ de SQ, aos 30 dias (Figura 3). Nenhuma alteração foi visível em relação aos vacúolos de absorção no epitélio da mucosa. Em comparação com os dados da literatura, observou-se maior quantidade de vasos linfáticos (ou lacteal central), em todos os peixes.

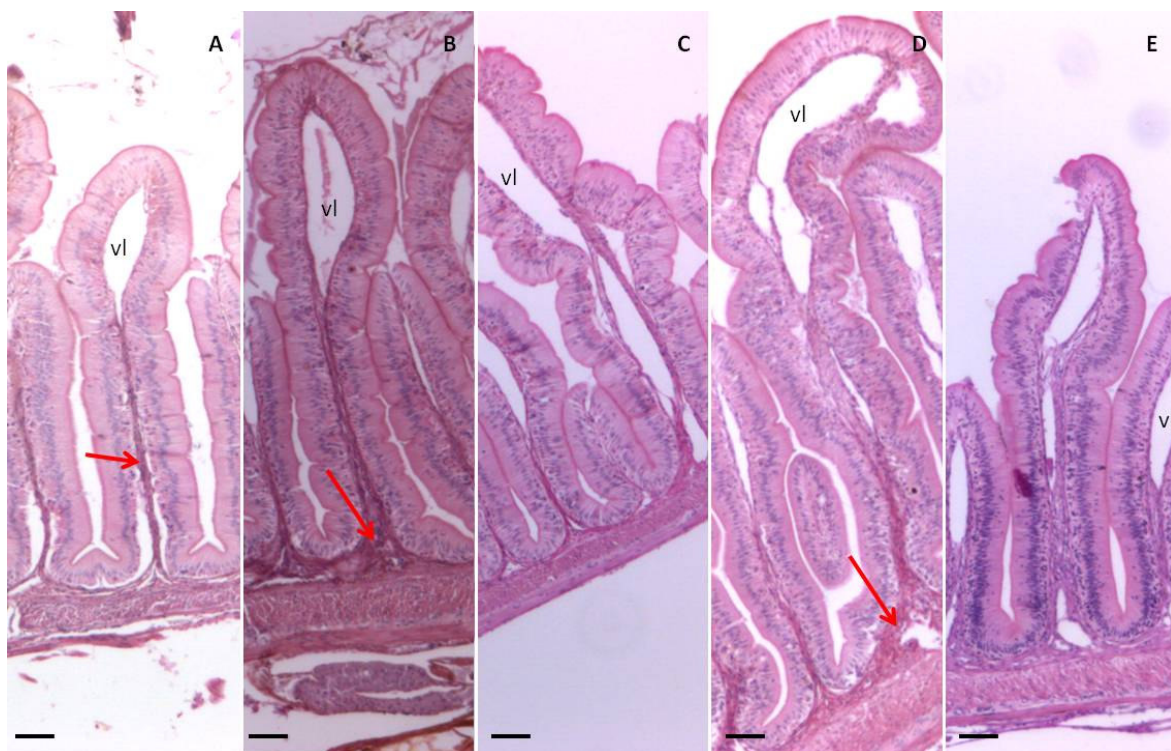


Figura 1: Seções histológicas de intestino de juvenis de pacu alimentados por sete dias com níveis crescentes de SQ na dieta (HE, 100x). **(A)** 0 mg kg⁻¹ SQ – vaso linfático (vl), presença de linfócitos na lâmina própria do vilão (setas); **(B)** 100 mg kg⁻¹ SQ – presença de linfócitos na lâmina própria do vilão (seta), vaso linfático (vl); **(C)** 200 mg kg⁻¹ SQ – vaso linfático (vl); **(D)** 300 mg kg⁻¹ SQ – folículo linfóide (seta), vaso linfático (vl); **(E)** 400 mg kg⁻¹ SQ – vaso linfático (vl). Escala: 50µm.

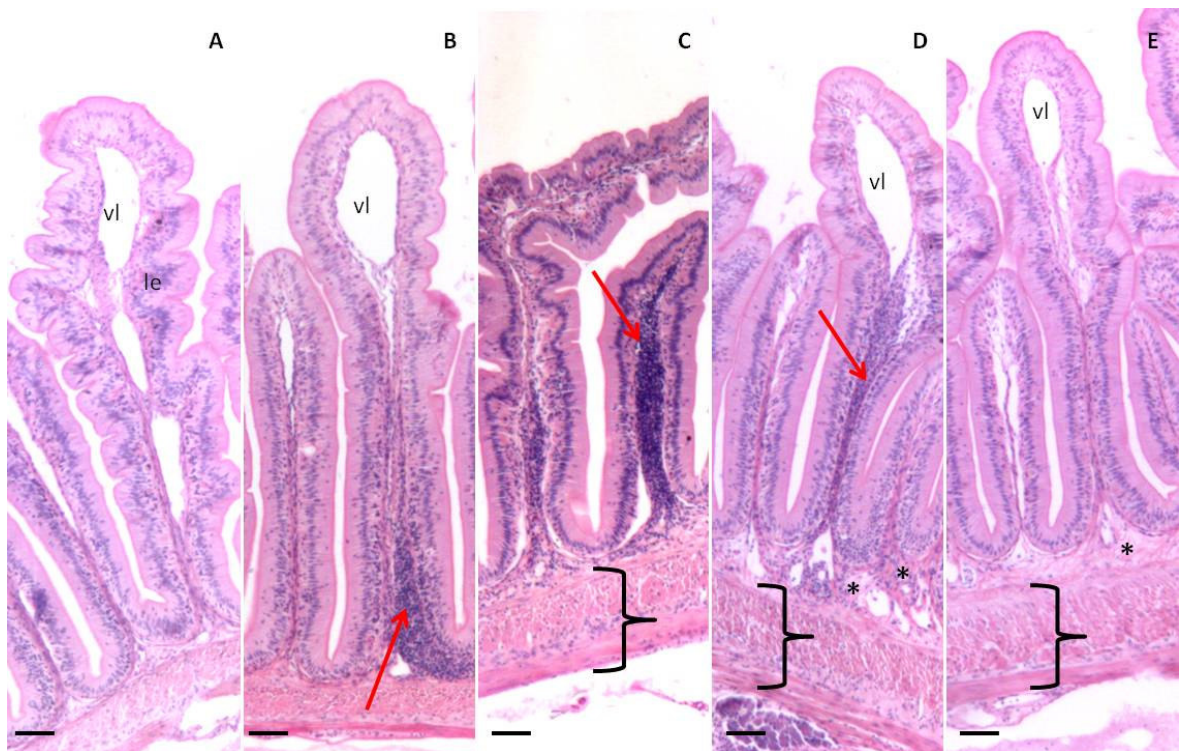


Figura 2: Seções histológicas de intestino de juvenis de pacu alimentados por 15 dias com níveis crescentes de SQ na dieta (HE, 100x). **(A)** 0 mg kg⁻¹ SQ - ocorrência de dobras irregulares na mucosa do vilo, lâmina epitelial visivelmente mais corada (lp), vaso linfático (vl); **(B)** 100 mg kg⁻¹ SQ - infiltrado inflamatório (presença de muitos linfócitos) (seta), vaso linfático (vl); **(C)** 200 mg kg⁻¹ SQ - infiltrado inflamatório (presença de muitos linfócitos) (seta), ocorrência de dobras irregulares na mucosa do vilo, espessamento da camada muscular externa (colchete); **(D)** 300 mg kg⁻¹ SQ – presença de linfócitos na lâmina própria do vilo (seta), espessamento da submucosa (*), espessamento da camada muscular externa (colchete), vaso linfático (vl); **(E)** 400 mg kg⁻¹ SQ - espessamento da submucosa (*), espessamento da camada muscular externa (colchete), vaso linfático (vl). Escala: 50µm.

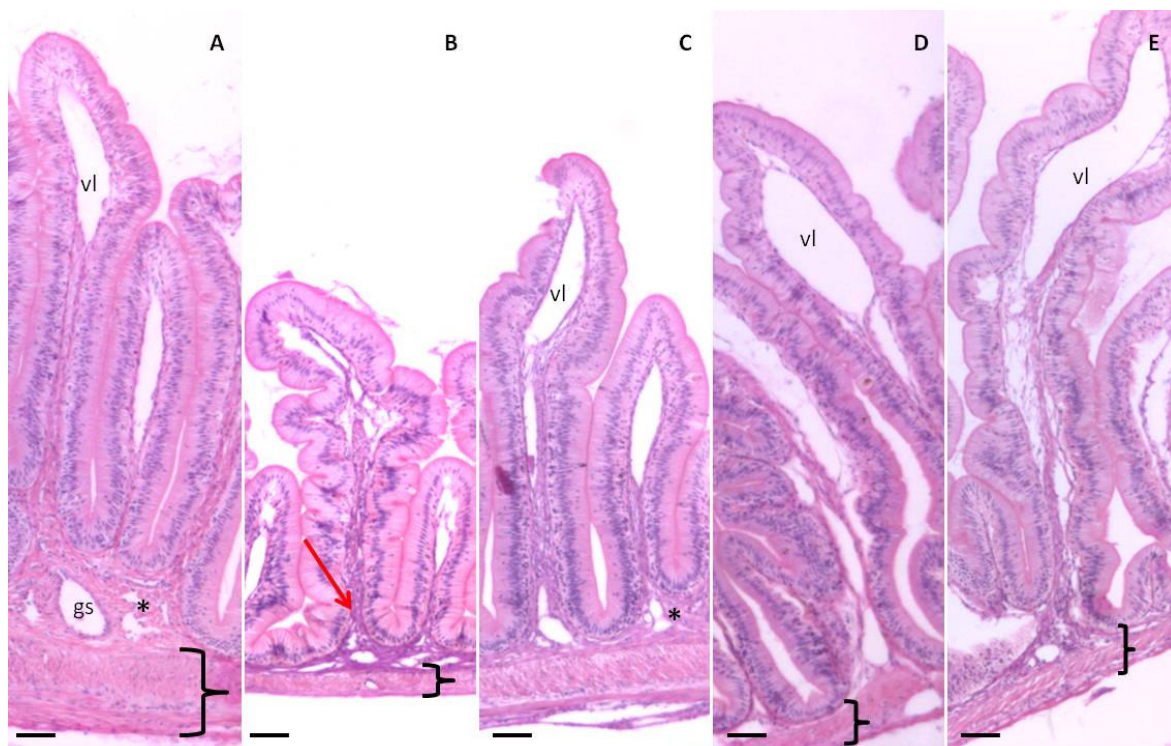


Figura 3: Seções histológicas de intestino de juvenis de pacu alimentados por 30 dias com níveis crescentes de SQ na dieta (HE, 100x). **(A)** 0 mg kg⁻¹ SQ - espessamento da camada muscular externa (colchete), glândula submucosa (gs), vaso linfático (vl), espessamento da submucosa (*); **(B)** 100 mg kg⁻¹ SQ – ocorrência de dobras irregulares na mucosa do vilo, estreitamento da camada muscular externa (colchete), presença de linfócitos na lâmina própria do vilo (seta); **(C)** 200 mg kg⁻¹ SQ - vaso linfático (vl), espessamento da submucosa (*); **(D)** 300 mg kg⁻¹ SQ - estreitamento da camada muscular externa (colchete), vaso linfático (vl); **(E)** 400 mg kg⁻¹ SQ - ocorrência de dobras irregulares na mucosa do vilo, estreitamento da camada muscular externa (colchete), vaso linfático (vl). Escala: 50µm.

4.0. DISCUSSÃO

A SQ incluída nas dietas oferecidas aos juvenis de pacu, por até 30 dias, não afetou as variáveis associadas ao desempenho dos peixes, embora Francis et al. (2001) tenham relatado resultados diferentes em relação ao GP e CA em tilápia, afirmando que os peixes que consumiram SQ foram mais eficientes que os peixes controle relacionando à menor excreção e à maior assimilação da energia presente na ração. Em outros estudos, o consumo de SQ também estimulou

enzimas intestinais (amilase e a tripsina), e enzimas do fígado [lactato desidrogenase (LDH) e a citocromo c-oxidase (CO)], facilitando a digestão de carboidratos e proteínas e proporcionando maior desempenho dos peixes pelo aumento da eficiência na absorção dos alimentos digeridos no intestino (Francis & Becker, 2007; Makkar et al., 2007; Serrano, 2013). Gee et al. (1996) enfatizaram que o aumento da permeabilidade aparente das bordas em escova intestinais promovido por níveis subletais de saponina de *Gypsophila* pode ter importantes implicações na absorção de macromoléculas, cuja passagem através do epitélio são normalmente restritas. Entretanto, resultados semelhantes não foram observados no presente estudo. Embora sem diferença estatística, os peixes que consumiram 400 mg kg⁻¹ de SQ na ração aos 30 dias apresentaram valor mais elevado de GP e menor CA, em relação aos demais tratamentos com SQ e os peixes controle.

A redução observada aos 15 dias dos níveis de colesterol dos peixes que consumiram SQ só ocorre em relação ao alto valor presente no grupo controle, não sendo significativo, no entanto, ao se comparar os demais tempos. Entretanto, outros estudos demonstram que a SQ possui papel importante na redução do colesterol endógeno, como já relatado em aves e ratos (Griminger & Fisher, 1958; Potter et al., 1993; Aslan et. al., 2005, Afrose et al., 2009). As saponinas, em geral, são classificadas em glicosídeos triterpenóides ou esteróides. Alguns alimentos de origem vegetal possuem saponinas em sua constituição e estas podem atuar como detergentes, do mesmo modo que os sais biliares, derivados do colesterol, atuam na digestão de lipídeos. Naturalmente, a absorção de lipídios no intestino ocorre com a agregação de sais biliares em micelas e lipossomas e a formação de micelas mistas com os produtos de digestão de gordura (Mayes & Botham, 2003). Com a SQ, segundo Cheeke (2000), a agregação da micela lipídica ocorre quando a parte hidrofóbica da saponina é atraída ao núcleo hidrofóbico do esterol (ligação lipofílica) e, junto aos ácidos biliares, age formando complexos insolúveis com colesterol no intestino (agregados maiores de 50 moléculas de SQ). Isto impede ou inibe a absorção e/ou reabsorção do colesterol proveniente da dieta e/ou dos ácidos biliares, sendo desviados do percurso normal (ciclo entero-hepático), o que aumenta sua excreção e pode diminuir a concentração do colesterol em animais e humanos

(Oakenfull et al., 1986; Cheeke, 2000; Cheeke & Otero, 2005). Ratos alimentados com saponina de *Gypsophylla* apresentaram redução do colesterol sérico e aumento no teor de colesterol total cecal (Gee & Johnson, 1988).

O menor perfil de triglicerídeos dos peixes que consumiram SQ, por sete dias, pode estar ligado a este fato. Ratos que consumiram dieta suplementada com SQ apresentaram redução do nível de triglicerídeos (Afrose et al., 2009). A administração oral de saponinas provenientes de outros vegetais como o ginseng, alfafa, yucca, soja e '*Panax notoginseng*', fornecidas para ratos, humanos e coelhos comprovaram o efeito na redução dos triglicerídeos (Milgate & Roberts, 1995; Wu et al., 2013).

A redução do IHS nos peixes que consumiram as dietas contendo 200, 300 e 400 mg kg⁻¹ de SQ aos 30 dias também foi observada por Francis et al. (2001) quando administraram SQ em dietas para tilápias. Estes efeitos, associados aos resultados do colesterol e triglicerídeos, sugerem que o consumo de SQ pode afetar o metabolismo lipídico, alterando o armazenamento do mesmo.

O cortisol é um hormônio do estresse que é liberado na corrente sanguínea do peixe a partir das células inter-renais do rim cefálico. Como esteróide, o cortisol é solúvel em lipídios e pode difundir-se através das membranas celulares sem ser armazenado. Este hormônio é produzido a partir do colesterol, quando as células do tecido intrer-renal são estimuladas por uma cascata hormonal (Ellis et al., 2012). A sua mensuração pode indicar alterações na regulação do metabolismo intermediário e parâmetros fisiológicos em peixes (Mommensen et al., 1999). No entanto, baixas ou altas concentrações de cortisol sanguíneo podem não ter significado para respostas de estimulação tecidual. Segundo Mommensen et al. (1999), a liberação de cortisol é dependente de diversos fatores como: ligações proteicas, receptores em tecidos alvo, catabolismo do cortisol, entre outros. Portanto, a concentração do cortisol plasmático reflete o balanço líquido da produção e consumo do mesmo. Segundo Ellis et al. (2012), o cortisol é um hormônio facilmente mensurado e é importante para avaliar o bem-estar dos peixes, pois afeta funções neurológicas e modifica seu comportamento. Portanto, no presente estudo, os níveis de cortisol dos peixes indicam ausência aparente de estresse, pois não há alterações significativas pela presença da SQ.

Segundo Mommsen et al. (1999), em peixes geralmente a glicose plasmática e o glicogênio hepático são medidos como indicadores do metabolismo. Entretanto a determinação da concentração de glicose no plasma fornece um reflexo estático (snapshot) da situação metabólica e não leva em conta o 'turnover' do metabólito em que as concentrações destes indicadores podem variar substancialmente dependendo do estado fisiológico do peixe. No presente estudo, não é possível observar um padrão nas respostas da glicemia, nem efeito da saponina. Na literatura não existem relatos do efeito do consumo da SQ sobre estas variáveis em peixes. Entretanto, outros animais como ratos diabéticos e galinhas que consumiram SQ e saponina proveniente da *Yucca schidigera* apresentaram hipoglicemia (Aslan et al. 2005; Fidan & Dündar, 2008).

Há diversos trabalhos que relatam os danos causados ao epitélio intestinal proveniente do consumo da soja. Estes estudos, principalmente com peixes de clima temperado, enfocam a substituição da farinha de peixe pela soja justamente pela diferença do custo final da ração. Para explicar a não adaptação destes peixes a esta substituição, muitos autores aprofundam seus estudos a procura de substâncias presentes na composição da soja que impossibilitam esta adaptação pela dieta. A saponina da soja, ou sua combinação com outros fatores não identificados, como fatores antinutricionais ou a própria microflora intestinal, induziu a reação inflamatória e enterite no intestino distal de salmão do Atlântico (Van Den Ingh et al., 1991 e 1996; Knudsen et al., 2007; Knudsen et al., 2008). Van den Ingh et al. (1996) relacionam este fato aos componentes da soja solúveis em álcool, como os oligossacarídeos e a saponina.

A saponina é um composto capaz de alterar a estrutura e função da membrana epitelial intestinal, justamente por sua atividade na superfície epitelial (Francis et al., 2001). No entanto, no presente estudo, foram visíveis apenas sinais de inflamação intestinal, pela forte presença de linfócitos no intestino, associados ao consumo de SQ pelos peixes dos tratamentos 100, 200 e 300 mg kg⁻¹, após 15 dias de alimentação. A carpa comum apresentou processo inflamatório, uma semana após a substituição da farinha de peixe por farelo de soja na dieta e, após a terceira semana, foi observado o encurtamento das pregas da mucosa, o desaparecimento dos vacúolos supranuclear, aumento do número de células caliciformes, o espessamento da lâmina e da mucosa subepitelial com

aumento do número de células de defesa, assim como a diminuição da capacidade de apreensão dos enterócitos (Urán et al., 2008). Dietas contendo 1,5 e 3,0 g kg⁻¹ de SQ, mais concentrado proteico de soja, causaram dano intestinal como irregularidades na forma dos enterócitos, presença de vacúolos no citoplasma apical de tamanho grande a muito grande entre outras alterações em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e 'chinook salmon' (*Oncorhynchus tshawytscha*), sem afetar significativamente o ganho de peso (Bureau et al., 1998). Gee & Johnson (1988) verificaram um significativo alargamento das criptas intestinais e aumento do tamanho das vilosidades, em ratos tratados com saponina de *Gypsophyila*, evidenciando um possível aumento na taxa de mitose. Rao & Kendall (1986) observaram aumento significativo do peso do intestino delgado em ratos que consumiram dietas suplementadas com SQ. Entretanto, Sorensen et al. (2011) não encontraram dano significativo no epitélio intestinal de salmão do Atlântico, no estudo em que testaram rafinose, estaquiase e saponina de soja.

De outro modo, a presença de linfócitos neste tecido é normal, pois o intestino apresenta uma barreira local contra a entrada de patógenos e por isso contém uma população de leucócitos responsáveis pela resposta imune (Mowat & Viney, 1997). Entretanto a presença de elevado número de linfócitos nesta região supõe a existência um processo inflamatório. O'Donnell et al. (1994) observaram que a administração oral de lipopolisacarídeos (LPS) provenientes de *Escherichia coli* para truta marrom (*Salmo trutta* L.) foi rapidamente absorvida através da região do intestino anterior para dentro do sistema circulatório, provocando uma resposta imune. Dalmo & Bogwald (1996) também observaram efeito semelhante sobre as LPS de *Aeromonas salmonicida* em salmão do atlântico (*Salmo salar* L.) após 24 e 48 horas de administração das mesmas. Acredita-se que o intestino anterior seja capaz de absorver macromoléculas e as distribui posteriormente para a circulação (Press & Eversen, 1999). Portanto a SQ, neste caso, pode estar atuando como uma macromolécula que, ao ser absorvida pelo intestino, pode estar agindo como um antígeno, estimulando a defesa local num tempo determinado de ação.

O pacu é um peixe de hábito alimentar onívoro e provavelmente desenvolveu mecanismos que permitem esta espécie digerir, absorver e metabolizar alimentos de origem vegetal e animal. Seus mecanismos de adaptação enzimática provavelmente respondem a mudanças na qualidade da dieta alterando a quantidade e composição de enzimas (Ostaszewska et al., 2005). Entretanto, as alterações consideradas neste estudo podem ser consequência da interação entre a SQ e outros componentes, assim como já relatado com a saponina da soja.

5.0. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo não evidenciaram efeitos em indicadores de estresse.

O consumo de saponina de quilaia, no período de sete dias, atuou na redução dos níveis de triglicerídeos dos peixes e do índice hepatossomático aos 30 dias, com 200, 300 e 400 mg kg⁻¹ de SQ.

Aos 15 dias do consumo de dietas contendo 100, 200 e 300 mg kg⁻¹ de SQ foram observados sinais de inflamação intestinal.

6.0. REFERÊNCIAS

AFROSE, S; HOSSAINA, Md. S.; MAKIB, T.; TSUJIIA. H. Karaya root saponin exerts a hypocholesterolemic response in rats fed a high-cholesterol diet. **Nutrition Research**, v. 29, pp. 350–354, 2009.

ASLAN, R.; DUNDAR, Y.; ERYAVUZ, A.; BULBUL, A.; KUÇUKKURT, I.; FIDAN, A. F.; AKINCI, Z. Effects of various quantities of *Yucca schidigera* powder (Deodorase) added to diets on the performance, some hematological and biochemical blood parameters, and total antioxidant capacity of laying hens. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 156(6), pp. 350-355, 2005.

BUREAU, D. P.; HARRIS, A. M.; YOUNG CHO, C. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.161, pp. 27–43, 1998.

CHAVALI, S. R. & CAMPBELL, J. B. Adjuvant effects of orally administered saponins on humoral and cellular immune responses in mice. **Immunobiology**, v. 174 (3), pp. 347-359, 1987.

CHEEKE, P. R. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. **Journal of Animal Science**, v. 77, pp. 1-10, 2000.

CHEEKE, P. R. Applications of saponins as feed additives in poultry production. **Poultry Industry**, <<http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/nutrition/articles/applications-saponins-feed-additives-t1451/141-p0.htm>> acessado 25 de abril de 2010, 2009.

CHEEKE, P.R., & OTERO, R.. *Yucca*, *quillaja* may have role in animal nutrition. **Feedstuffs**, 2005.

DALMO, R. A. & BOGWALD, J. Distribution of intravenously and perorally administered *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 6, pp. 427–441, 1996.

ELLIS, T.; YILDIZ, H. Y.; LÓPEZ-OLMEDA, J.; SPEDICATO, M. T.; TORT, L.; ØVERLI, Ø; MARTINS, C. I. M. Cortisol and finfish welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, pp. 163-188, 2012.

FIDAN, A. & DÜNDAR, Y. The effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* on DNA damage, protein oxidation, lipid peroxidation, and some biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 22, pp. 348–356, 2008.

FRANCIS, G. & BECKER, K. Plant saponins In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D. M. **Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish**, CAB International 2007.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Effects of *Quillaja* saponins on growth, metabolism, egg production and muscle cholesterol in individually reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.129, pp.105-114, 2001.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Quillaja* saponins - a natural growth promoter for fish. **Animal Feed Science and Technology**, v.121, pp.147-157, 2005.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Effects of cyclic and regular feeding of a *Quillaja* saponin supplemented diet on growth and metabolism of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, pp. 343–350, 2002.

GEE, J. M. & JOHNSON, I. T. Interactions Between Hemolytic Saponins, Bile Salts and Small Intestinal Mucosa in the Rat. **The Journal of Nutrition**, v. 118, pp. 1391-1397, 1988.

GEE, J. M.; WORTLEY, G. M.; JOHNSON, I. T.; PRICE, K. R.; RUTTEN, A. A. J. J. L.; HOUBEN, G. F.; PENNINKS, A. H. Effects of saponins and glycoalkaloids on the permeability and viability of mammalian intestinal cells and on the integrity of tissue preparations In vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 10, pp.117-128, 1996.

GRIMINGER, P. & FISHER, H. Dietary saponin and plasma cholesterol in the chicken. Proceedings of the Society for **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 99 (2), pp. 424-426, 1958.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAG, O. & MAZZA, G. Saponins: properties, applications and processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47 (3), pp. 231-258, 2007.

HAUPTLI, L. & LOVATTO, P. A. Alimentação de porcas gestantes e lactantes com dietas contendo saponinas. **Ciência Rural**, v.36 (2), pp. 610-616, 2006.

KNUDSEN, D.; JUTFELT, F.; SUNDH, H.; SUNDELL, K.; KOPPE, W. FRØKIÆR, H. Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role

in the onset of soya bean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**, v. 100, pp. 120–129, 2008.

KNUDSEN, D.; URAÄ N, P.; ARNOUS, A.; KOPPE, W.; FRØKIÆR, H. Saponin-containing subfractions of soybean molasses induce enteritis in the distal intestine of Atlantic salmon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, pp. 2261-2267, 2007.

MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal**, v. 1(9), pp. 1371–1391, 2007.

MALINOW, M. R.; MCNULTY, W. P.; MCLAUGHLIN, P.; STAFFORD, C.; BURNSA, A. K.; LIVINGSTON, L.; KOHLER, G. O. The toxicity of alfalfa saponins in rats. **Food and Cosmetic Toxicology**, v. 19, pp. 443-445, 1981.

MAYES, P. A. & BOTHAM, K. M. Lipids of physiologic significance *In*: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. (Eds.). **Harper's Illustrated Biochemistry**, Twenty-Sixth Edition. The McGraw-Hill Companies, Chapter 14, pp. 111-121, 2003.

MILGATE, J. & ROBERTS, D. C. K. The Nutritional & Biological Significance of Saponins. **Nutrition Research**, v. 15 (8), pp. 1223-1249, 1995.

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, pp. 211–268, 1999.

MOWAT, A. McL. & VINEY, J. L. The anatomical basis of intestinal immunity. **Immunological Reviews**, v. 156, pp. 145-166, 1997.

NINOMIYA, M.; HATTA, H.; FUJIKI, M.; KIM, M.; YAMAMOTO, T.; KUSUDA, R. Enhancement of chemotactic activity of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) leucocytes by oral administration of quillaja saponina. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, pp. 325–328, 1995.

O'DONNELL, G. B.; SMITH, P. R.; KILMARTIN, J. J.; MORAN, A. P. Uptake and fate of orally administered bacterial lipopolysaccharide in brown trout (*Salmo trutta*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 4, pp. 285-299, 1994.

OAKENFULL, D. Aggregation of Saponins and Bile Acids in Aqueous Solution. **Australian Journal of Chemistry**, v. 39, pp. 1671-1683, 1986.

OAKENFULL, D. Saponins in food - A Review. **Food Chemistry**, v. 6, pp. 19-40, 1981.

OSTASZEWSKA, T.; DABROWSKI, K.; PALACIOS, M. E.; OLEJNICZAKA, M.; WIECZOREK, M. Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. **Aquaculture**, v. 245, pp. 273– 286, 2005.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (Eds.). Estudo Setorial para Consolidação de uma Aquicultura Sustentável no Brasil. Curitiba, 279 p., 2007.

POTTER, S. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; POLLACK, J.; LONE, T. A.; BERBER-JIMENED, M. D. Protein-saponin interaction and its influence on blood lipids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 41, pp. 1287-1291, 1993.

PRESS, C. McL & EVERSEN, Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, pp. 309–318, 1999.

RAO, A. V. & KENDALL, C. W. Dietary saponins and serum lipids. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 24 (5), p. 441, 1986.

SERRANO, A. E. Effects of Quillaja saponins on growth, feed efficiency, digestive enzyme activities and metabolism of common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 19, pp. 468-474, 2013.

SØRENSEN, M.; PENN, M.; EL-MOWAFI, A.; STOREBAKKEN, T.; CHUNFANG, C.; ØVERLAND, M.; KROGDAHL, A. Effect of stachyose, raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility, digestive enzymes,

gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). **Aquaculture**, v. 314, pp. 145-152, 2011.

URÁN, P.A.; GONÇALVES, A.A.; TAVERNE-THIELE, J.J.; SCHRAMA, J.W.; VERRETH, J.A.J.; ROMBOUT, J.H.W.M. Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, pp. 751-760, 2008.

VAN DEN INGH, T.S.G.A.M.; KROGDAHL, A.; OLLI, J.J.; HENDRIKS, H.G.C.J.M.; KONINKX, J.G.J.F. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*) : a morphological study. **Aquaculture**, v. 94, pp. 297-305, 1991.

VAN DEN INGH, T.S.G.A.M.; OLLI, J.J.; KROGDAHL, A. Alcohol-soluble components in soybeans cause morphological changes in the distal intestine of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 19, 47-53, 1996.

WU, J-H; LEUNG, G. P-H; KWAN, Y-W; SHAM, T-T; TANG, J-Y; WANG, Y-H; WAN, J-B; LEE, S. M-Y; CHAN, S-W. Suppression of diet-induced hypercholesterolaemia by saponins from *Panax notoginseng* in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, pp. 1159–1169, 2013.

CAPÍTULO – III

**Efeito do consumo da saponina de Quilaia (*Quillaja saponaria*
Molina) sobre variáveis imunes não específica do pacu**

RESUMO

Dietas contendo níveis crescentes de extrato purificado de saponina de quilaia (SQ) foram testadas para avaliar seu efeito sobre as análises fisiológicas (glicose, proteína total e albumina), imunológicas [concentração de lisozima sérica, atividade respiratória de leucócitos (ARL), contagem total e diferencial de leucócitos, globulina e relação A:G], hematológicas [hematócrito, número de eritrócitos, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)] e sobrevivência de juvenis de pacu após desafio pela *Aeromonas hydrophila*. O experimento foi desenvolvido em três etapas, nas quais os peixes foram mantidos no sistema experimental por sete, 15 e 30 dias. Em cada etapa, 350 juvenis de pacu ($59,7 \pm 3,4$ g) foram divididos e distribuídos em 25 aquários (200L), num delineamento inteiramente casualizado. Os peixes receberam dietas isoprotéicas (27,90% de PB), isoenergéticas ($4030 \text{ cal EB g}^{-1}$) e isofibrosas (4% de FB), contendo níveis crescentes (0; 100; 200; 300; 400 mg kg^{-1}) de SQ. Ao final de cada etapa experimental, um lote de 25 peixes ($n=5$) foi separado para coleta de material biológico. Os peixes remanescentes (325) foram inoculados com injeção intraperitoneal de suspensão bacteriana de *Aeromonas hydrophila* na cavidade abdominal e transferidos para outro sistema experimental. Foi observada a ocorrência dos sinais clínicos da doença, contabilizado a mortalidade dos peixes e, ao final de seis dias, foi feita outra coleta de material biológico para as análises. A sobrevivência do pacu frente a infecção experimental com *Aeromonas hydrophila* foi maior apenas após o consumo de 200 mg kg^{-1} de SQ aos sete dias. Os efeitos estimulantes observados foram: aumento da ARL após sete dias de alimentação com 100 e 200 mg kg^{-1} de SQ e na concentração de lisozima após 15 dias nas mesmas concentrações de SQ, independente do desafio com *Aeromonas hydrophila*. Em relação ao número de células sanguíneas, o número de trombócitos aumentou e diminuiu antes e após o desafio bacteriano, respectivamente, nos peixes que receberam 400 mg kg^{-1} de SQ com 15 e 30 dias de alimentação. Os demais resultados mostram que a SQ, nas concentrações e tempos de administração testados, não interferiu nas respostas imunes inatas dos juvenis de pacu avaliadas frente a infecção experimental, nem nos parâmetros hematológicos.

Palavras chave: *Aeromonas hydrophila*, desafio, parâmetros hematológicos, *Piaractus mesopotamicus*, sistema imune não específico.

ABSTRACT

Diets containing increasing levels of purified extract of quillaja saponin (QS) were tested to evaluate their effect on the physiological analyzes (glucose, total protein and albumin), immunological [concentration of serum lysozyme, leukocytes respiratory activity (LRA), total and differential leukocyte count, globulin and the A:G index], hematological [hematocrit, number of erythrocytes, hemoglobin, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)] and survival pacu after challenge by *Aeromonas hydrophila*. The experiment was conducted in three stages in which the fish were kept in the experimental system for seven, 15 and 30 days. At each step, 350 pacu (59.78 ± 3.40 g) were divided and distributed in 25 cages (200L) in a completely randomized design, were fed five diets based on extracts of QS (0; 100; 200; 300; 400 mg kg⁻¹). The fish were fed diets (isonitrogenous= 27.90% CP, isocaloric = 4030 cal g⁻¹ CE and isofibrous 4% CF) with increasing levels QS (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹). At the end of each experimental phase a parcel of 25 fish (n=5) was separated for collection of biological samples for analysis. The remaining fish (about 325) were inoculated by intraperitoneal injection in the abdominal cavity of bacterial suspension of *Aeromonas hydrophila* and transferred to another experimental system. Occurrence of clinical signs and survival of all samples was account after challenge by *Aeromonas hydrophila* and at the end of six days, was done another collection of biological material for analysis. At seven days, the survival of pacu against experimental infection was higher after consumption 200 mg kg⁻¹ QS. The stimulant effects observed: increased the LRA after seven days of 100 and 200 mg kg⁻¹ QS feeding and concentration of lysozyme on 15 days in the same QS concentrations, independent of challenge with *Aeromonas hydrophila*. With regard to number of blood cells after bacterial challenge, the thrombocytes number increased and decline before and after bacterial challenge, respectively in fishes who received 400 mg kg⁻¹ QS at 15 and 30 days of feeding. The results show that QS concentrations and times of

administration tested did not interfere with the innate immune responses pacu against experimental infection with *Aeromonas hydrophila*, neither hematologic parameter.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, challenge, hematological parameters, *Piaractus mesopotamicus*, non-specific immune system.

1.0. INTRODUÇÃO

As infestações por patógenos, de modo geral, sempre preocuparam os piscicultores. Os peixes, em vida livre, normalmente são acometidos por enfermidades, entretanto, com a intensificação da criação, o risco de doenças graves se ampliou consideravelmente, aumentando a mortalidade e os prejuízos ao produtor. Os tratamentos de combate às doenças, geralmente, são onerosos e, quando eficazes, demandam muita mão de obra, tornando os investimentos e lucratividade no setor aquícola ameaçados.

Os estímulos estressores presentes numa piscicultura podem contribuir para a invasão de diversos patógenos no organismo dos peixes. Esses podem variar dentre diversos fatores como manejo, qualidade da água, temperatura, qualidade da ração, estação do ano, idade, sexo, condição fisiológica, entre outros. A resposta a estes estímulos estressores pode desencadear mudanças na homeostase fisiológica do animal, ocasionando atraso do crescimento, reprodução e comprometimento do sistema imune que permite a entrada de micro-organismos patogênicos oportunistas e ocasiona doenças e consequente morte tardia do animal (Wendelaar Bonga, 1997).

O sistema imune dos peixes possui dois tipos de respostas: específica, ou adquirida, e não específica, ou inata. Este é organizado por células e moléculas capazes de defender o organismo contra a invasão de patógenos, e é estimulado assim que estes entram em contato com o organismo (não específica) ou quando o agente invasor é reincidente (específica) (Delves & Roitt, 2000).

Os imunostimulantes promovem a proteção do organismo às doenças infecciosas pelo aumento dos mecanismos de defesa não específicos. O uso dessas substâncias suplementadas nas dietas amplia o número de células responsáveis pela defesa inata de peixes promovendo resistência aos patógenos (Sakai, 1999). A otimização do sistema imune parece ser o método mais eficiente para a prevenção de doenças em peixes (Ardó et al., 2008).

A indústria aquícola utiliza-se de um vasto conhecimento em imunostimulantes como vitaminas, quitina, glucanos, microorganismos, extratos de plantas, para fabricação de seus produtos (Sakai, 1999). E, independente do tipo de exposição, via oral, banho ou vacinal, as substâncias obtidas de fontes naturais têm recebido mais atenção em relação à utilização em peixes. Por isso, um grande número de produtos vegetais/ervas como *Aloe vera* (Zanuzzo et al., 2012), *Astragalus membranaceus* e *Lonicera japonica* (Ardó et al., 2008), *Eclipta alba* (Christy et al., 2007), *Radix astragalus* seu *Hedysari* e *Radix angelicae Sinensis* (Jian & Wu, 2004), *Allium sativum* (Lee & Gao, 2012), *Astragalus radix* e *Scutellaria radix* (Yin et al., 2006), entre outras, têm sido relacionadas com o aumento da resposta imune não específica em peixes. Ultimamente, estes produtos recebem mais atenção por serem baratos, serem facilmente incorporados às dietas e por possuírem baixo impacto ao meio ambiente (Aly & Mohamed, 2010).

A saponina de quilaia é uma substância natural extraída da casca de árvores chilenas (*Quillaja saponaria* Molina). Diversos estudos a descrevem como promotora de vários benefícios aos animais. Dependendo da via de administração, os efeitos benéficos variam desde propriedades imunostimulante, anticarcinogênica, atividade antimicrobiana até promoção do crescimento, entre outros (Chavali et al., 1988; Ninomiya et al., 1995; Rao & Sung, 1995; Lacaille-Dubois & Wagner, 1996; Cheeke, 2000; Francis et al., 2001 e 2002). A administração oral de SQ como aditivo em rações promoveu a resistência dos animais aos desafios e às doenças sugerindo que as saponinas possuam efeitos imunostimulatórios além de múltiplas propriedades benéficas (Cheeke, 2000). Chavalli & Campbell (1987) observaram a proliferação de linfócitos sete dias após a administração oral de SQ com antígeno da raiva (Ag + SQ) inativado em camundongos, enquanto a aplicação do antígeno demorou 21 dias. No mesmo

trabalho, os autores observaram que o consumo isolado de SQ aumentou a atividade das células “natural killers” por mais quatro semanas. O consumo de SQ por ‘yellowtail’ (*Seriola quinqueradiata*) estimulou a migração de leucócitos, demonstrando, assim, considerável função nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Ninomiya et al., 1995).

Uma das enfermidades mais difundida no mundo aquícola é causada por uma bactéria chamada *Aeromonas hydrophila*. Ela é responsável pela septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões na superfície da pele (Garcia & Moraes, 2009). A infecção pode, ainda, incluir outros sinais externos como exoftalmia, brânquias pálidas e distensão abdominal causada pelo acúmulo de fluído ascítico. Internamente, nota-se um quadro de anemia com muitas áreas pálidas e danos severos aos órgãos (Camus et al., 1998). É vastamente distribuída no meio ambiente e é considerada uma bactéria oportunista, pois é capaz de desencadear a doença quando um organismo encontra-se em situação de estresse (manejo, alimentação, qualidade da água, etc.) (Camus et al., 1998; Daskalov, 2006).

O objetivo de muitas pesquisas com ração para peixes é a identificação de substâncias que possam promover o crescimento e o mecanismo de defesa imune não específico desses animais. Portanto, este estudo avaliou as respostas fisiológicas, hematológicas e imunes não específicas de pacus alimentados com rações contendo níveis crescentes de inclusão de extrato purificado de saponina de quilaia (SQ) antes e após desafio pela bactéria *Aeromonas hydrophila*.

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Experimento

O estudo foi dividido em três etapas experimentais de sete, 15 e 30 dias, que foram divididos em duas fases: fase de alimentação e fase de desafio. A primeira fase foi realizada no Laboratório de Peixes Ornamentais do Centro de Aquicultura da Unesp e a segunda fase no Biotério do Departamento de Morfologia e

Fisiologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal.

2.1.1. Acondicionamento e manejo dos peixes

Em cada etapa, foi selecionado um lote homogêneo de 350 juvenis de pacu, totalizando ao final das três etapas, 1050 peixes. Estes peixes apresentavam peso e tamanho médio inicial de $59,7 \pm 3,4$ g; $14,1 \pm 0,3$ cm, respectivamente, e foram aleatoriamente estocados em 25 caixas de 200L, na densidade de 14 peixes/caixa. A aclimação dos peixes foi feita no mesmo sistema experimental durante sete dias. Este sistema era estático com aeração e aquecimento individual. Durante a fase de aclimação e período experimental, os animais foram alimentados até a saciedade aparente em dois períodos ao dia, às 10:00 e 16:30h.

A qualidade da água foi monitorada semanalmente pela análise da concentração de oxigênio dissolvido ($5,09 \pm 0,40$ mg L⁻¹) e temperatura ($27,2 \pm 0,93$ °C, pelo medidor YSI 55) e o pH ($6,0 \pm 0,16$ por phmetro digital de bancada). Diariamente, os aquários experimentais foram sifonados para a retirada de sobras de dietas, acúmulo de excretas, sendo feita a renovação de 2/3 da água.

No final de cada período experimental, os peixes remanescentes foram inoculados com a bactéria e mantidos no Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal.

2.1.2. Dietas experimentais

Foram avaliadas dietas práticas com quatro níveis de inclusão de extrato de quilaia (Sigma S7900) e uma dieta controle, que constituíram cinco tratamentos. As dietas foram formuladas com base nas exigências nutricionais da espécie, e tinham perfil isoenergético (4030 cal de EB g⁻¹), isofibroso (4,0% de FB) e isoprotéico (27,90 % de PB). Estas dietas foram adicionadas 0, 100, 200, 300 e 400 mg kg⁻¹ da saponina purificada, as quais constituíram os tratamentos. As

dietas elaboradas, após a pesagem e homogeneização dos ingredientes, receberam água a 55 °C, na proporção de 25% do peso total da mistura e foram peletizadas em grânulos de 4 mm de diâmetro e desidratadas logo após em estufa de ventilação forçada a 55 °C, durante 24h. Em seguida, os grânulos foram fracionados em diferentes diâmetros, para ajustarem-se ao tamanho da boca dos animais, e posteriormente armazenados a -18 °C até o uso.

2.1.3. Coleta de material biológico

Ao final das fases de alimentação e desafio, de cada período experimental (sete, 15 e 30 dias), um peixe por aquário (n=5) foi anestesiado em solução alcoólica de benzocaína (0,1 g L⁻¹) pesado e medido. Foi realizada a coleta de sangue por punção do vaso caudal, para a realização das análises fisiológicas hematológicas e imunológicas.

Uma alíquota de sangue de cada animal foi separada em três microtubos, um para a separação do soro para análises de proteína total, albumina e lisozima, outro com EDTA para a determinação da atividade respiratória de leucócitos, hemoglobina, eritrócito e hematócrito e o último com Glistab (Fluoreto de Potássio + EDTA), para a determinação da glicose plasmática.

2.1.4. Desafio por *Aeromonas hydrophila*

Ao final de cada fase de alimentação, de cada etapa experimental (sete, 15 e 30 dias), os peixes remanescentes de cada etapa (325) foram anestesiados com solução alcoólica de benzocaína e inoculados com injeção intraperitoneal com 1 mL de suspensão bacteriana de *Aeromonas hydrophila*. A concentração DL₅₀ foi de 1x10⁷ bactérias mL⁻¹ e esta foi estabelecida previamente numa amostragem piloto durante sete dias. Estes peixes foram distribuídos num sistema experimental de 25 caixas de 160L cada, numa densidade de 13 peixes/caixa. Após a inoculação, foi observada a ocorrência de mortalidade e demais sinais clínicos durante seis dias. Ao final deste período, um peixe por caixa (n=5) foi

anestesiado com solução alcoólica de benzocaína (0,1 g L⁻¹) para a coleta de sangue para a realização das análises fisiológicas, hematológicas e imunológicas.

2.2. Análises

2.2.1. Variáveis bioquímicas e hematológicas

Para a determinação das concentrações plasmática de glicose e séricas de albumina e proteína total foram utilizados os kits colorimétricos, glicose Liquiform (ref. 133-2/500), albumina (ref. 19) e proteínas totais (ref. 99-250), da Labtest Diagnóstica, respectivamente. A concentração de hemoglobina (Hb) foi obtida através de amostras de sangue total pelo kit colorimétrico de hemoglobina (ref. 43) da Labtest Diagnóstica. Todas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro.

A contagem do número de eritrócitos (Er), feita em câmara hematimétrica de Neubauer, foi realizada utilizando 2 mL de solução de citrato formol como diluente para cada 10µL de sangue total, resultando na diluição final de 1:200. Com micropipeta, a solução preencheu cada retículo da câmara por capilaridade e a leitura foi feita em microscópio com aumento de 400x. O resultado foi expresso em número de células x 10⁶ mm⁻³ de sangue.

Para a determinação do hematócrito foi coletada uma amostra de sangue total em tubos capilares que foram centrifugados por 5 minutos, a 3000 RPM e lidos em cartão para microhematócrito, para determinação do percentual de hematócrito (Ht).

Com os resultados da concentração de hemoglobina (Hb), do número total de células (Er) e do hematócrito (Ht) foram calculados os índices hematimétricos absolutos, como a seguir:

$$\text{VCM} = \left(\frac{\text{Ht} \times 10}{\text{Er}} \right)$$

Onde:

VCM = volume corpuscular médio (mm⁻³);

Ht = porcentagem de hematócrito;

Er = número total de células vermelhas.

$$\mathbf{HCM} = \left(\frac{Hb \times 10}{Er} \right)$$

Onde:

HCM = Hemoglobina corpuscular média (mg);

Hb = concentração de hemoglobina;

Er = número total de células vermelhas.

$$\mathbf{CHCM} = \left(\frac{Hb \times 100}{Ht} \right)$$

Onde:

CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (g dL⁻¹);

Hb = concentração de hemoglobina;

Ht = porcentagem de hematócrito.

2.2.2. Parâmetros Imunológicos

2.2.2.1. Atividade respiratória de leucócitos

Esta análise seguiu protocolo de acordo com Biller-Takahashi et al. (2013). Este determina a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzida pela explosão respiratória de leucócitos, a qual promove a redução do corante “*nitroblue tetrazolium*” (NBT, Sigma, St. Louis, MO, USA). Esta reação colorimétrica forma precipitados de material insolúvel de coloração azul escuro no interior do fagócito. A leitura é realizada em espectrofotômetro e comprimento de onda de 540 nm.

2.2.2.2. Concentração de lisozima sérica

A concentração de lisozima sérica foi determinada com base no método clássico de Smolelis & Hartsell (1949), no qual uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* é usada como substrato para lise, que é medida pela redução da densidade óptica em espectrofotometria. A análise foi realizada por ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) e adaptado por Marzocchi-Machado et al. (1999) e Abreu et al. (2009).

2.2.2.3. Contagem total e diferencial de leucócitos

Extensões sanguíneas foram coradas pelo corante Rosenfeld e utilizadas para as contagens diferencial e total dos leucócitos e contagem total de trombócitos. As imagens dos campos das lâminas com extensões sanguíneas foram capturadas em microscópio óptico e a contagem manual feita em software analisador de imagens (ImageJ 1.45s). Os leucócitos foram quantificados pelo método indireto, considerando a quantidade de leucócitos encontrada a cada 2000 eritrócitos contados. Foram contadas 200 células brancas e a quantidade de cada célula foi expressa pela porcentagem da mesma em relação ao total.

2.2.2.4. Determinação de globulinas e relação A:G

A concentração de globulinas foi determinada através de cálculo diferencial (proteína total – albumina) e a relação albumina-globulina (A:G) foi calculado dividindo-se o valor da fração albumina pelo valor total da fração globulina de cada amostra.

2.3. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância simples (ANOVA). Quando constatada diferença significativa entre as médias, aplicou-se o teste de Duncan.

As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS ao nível de 5,0% de significância.

3.0. RESULTADOS

3.1. Manejo dos peixes

Não houve mortalidade dos peixes durante as fases de alimentação.

3.2. Variáveis bioquímicas e hematológicas

De acordo com a Tabela 1, independente do tratamento e do tempo de alimentação, as concentrações de glicose plasmática são reduzidas após o desafio bacteriano, exceto nos peixes que receberam 100 mg kg⁻¹ de SQ por 15 dias. Aos sete dias, os peixes que receberam 200 e 400 mg kg⁻¹ de SQ apresentaram os valores de glicose mais elevados, sem caracterizar um padrão regular. Foi possível observar a redução da glicemia em todos os tratamentos conforme aumenta o tempo de administração das dietas antes do desafio.

Tabela 1 - Concentração plasmática da glicose (mg/dL) de pacus alimentados por sete, 15 e 30 dias com níveis crescentes de SQ na dieta antes e depois do desafio com *Aeromonas hydrophila* (n=5).

VAR	TP	DES	Saponina de quilaia (mg kg ⁻¹)				
			0	100	200	300	400
Glicose (mg/dL)	7	A	80,09 ±8,9 ^{Ba(A)}	82,45 ±4,4 ^{Ba(A)}	102,04 ±8,0 ^{Aa(A)}	82,76 ±1,9 ^{Ba(A)}	96,13 ±3,5 ^{Aa(A)}
		D	54,45 ±13,9 ^{Ab(a)}	55,04 ±1,6 ^{Ab(a)}	48,72 ±3,9 ^{Ab(a)}	49,84 ±4,4 ^{Ab(a)}	51,59 ±3,5 ^{Ab(ab)}
	15	A	74,60 ±6,2 ^{Aa(A)}	63,59 ±3,0 ^{Ba(B)}	73,92 ±9,4 ^{Aa(B)}	72,82 ±4,3 ^{Aa(B)}	78,71 ±5,9 ^{Aa(B)}
		D	49,40 ±2,9 ^{Ab(a)}	55,06 ±8,6 ^{Aa(a)}	50,58 ±7,3 ^{Ab(a)}	54,34 ±6,4 ^{Ab(a)}	57,95 ±6,2 ^{Ab(a)}
	30	A	62,61 ±1,9 ^{Aa(B)}	71,93 ±17,0 ^{Aa(AB)}	66,34 ±6,7 ^{Aa(B)}	69,68 ±3,4 ^{Aa(B)}	62,68 ±4,2 ^{Aa(C)}
		D	49,52 ±7,3 ^{Ab(a)}	40,00 ±3,2 ^{Ab(b)}	50,41 ±7,4 ^{Ab(a)}	37,33 ±17,3 ^{Ab(a)}	44,06 ±8,2 ^{Ab(b)}

VAR: Variável; TP – Tempo de alimentação; A: Antes do desafio com *Aeromonas hydrophila*, D: Depois do desafio com *Aeromonas hydrophila*. Médias ($\mu \pm$ DP) com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p>0,05$). Letras maiúsculas comparam concentrações de SQ no mesmo tempo e letras minúsculas comparam antes e depois do desafio. Letras maiúsculas entre parênteses comparam TP antes do desafio e letras minúsculas entre parênteses comparam TP depois do desafio.

Observou-se que os peixes das dietas 100 e 200 mg kg⁻¹ apresentaram aumento da albumina após o desafio em todos os tempos de alimentação, mas sem diferenças significativas (Tabela 2). Apenas aos 30 dias, os peixes que receberam 100 mg kg⁻¹ de SQ apresentaram concentração maior após o desafio, em relação aos tratamentos 300 e 400 mg kg⁻¹ de SQ. Com 15 dias de alimentação, antes do desafio, a produção de ALB diminuiu nos peixes que consumiram 100 e 200 mg kg⁻¹ de SQ, mas não nas dietas 300 e 400 mg kg⁻¹ de SQ, que foi estatisticamente igual aos peixes do tratamento controle. Houve aumento da concentração de ALB antes do desafio, conforme o aumento do tempo de administração das dietas contendo 100 e 200 mg kg⁻¹ de SQ. Após o desafio, aumentou o perfil da albumina nos peixes da dieta 100 mg kg⁻¹ de SQ com o aumento do tempo de administração da dieta.

A maior concentração de proteína total (PPT) foi apresentada pelos peixes que consumiram 300 e 400 mg kg⁻¹ de SQ por sete dias antes e depois do desafio, respectivamente (Tabela 2). A concentração de PPT sofreu leve queda nos peixes que consumiram SQ em comparação ao grupo controle, com 15 dias de alimentação, antes do desafio. Após o desafio, neste mesmo tempo, os peixes das dietas 100 e 400 mg kg⁻¹ de SQ, apresentaram a maior concentração. Após o desafio bacteriano, todos os peixes, do tempo 30, apresentaram queda na produção de PPT.

A concentração de GLO dos peixes que consumiram 100 e 400 mg kg⁻¹ de SQ por sete dias, foi maior em relação ao grupo controle e aumentou depois do desafio em relação a antes do desafio (Tabela 2). Os peixes que consumiram 100, 200 e 300 mg kg⁻¹ de SQ, por 15 dias, apresentaram aumento da concentração após o desafio, entretanto sem diferença estatística com o grupo controle. Após o desafio, todos os peixes alimentados por 30 dias, apresentaram queda na concentração de GLO em relação ao observado antes do desafio, entretanto os peixes dos tratamentos 200, 300 e 400 mg kg⁻¹ de SQ tiveram maiores níveis de GLO. Houve menor concentração de GLO entre os peixes alimentados por 15 dias, no tratamento 300 mg kg⁻¹ de SQ, antes do desafio. Depois do desafio, todos os peixes alimentados por 30 dias apresentaram menor concentração de GLO em comparação aos demais tempos.

Antes do desafio, os peixes que receberam o tratamento contendo 300 mg kg⁻¹ de SQ, por 15 dias, apresentaram maior relação A:G em comparação aos demais grupos (Tabela 2). Entretanto, após o desafio, foi o único tratamento que reduziu a relação A:G. A relação A:G foi bastante elevada nos peixes da dieta 100 mg kg⁻¹ de SQ, do tempo 30, após desafio (Tabela 2). Todos os tratamentos do tempo sete de alimentação, antes do desafio, apresentaram menor A:G em comparação aos demais tempos. Após o desafio, a maior relação A:G foi apresentada pelos peixes dos tratamentos do tempo 30 de alimentação, independentemente do nível de SQ na dieta.

Tabela 2 - Concentração de albumina (ALB), de proteína total (PPT), concentração de globulinas (GLO) e a relação albumina-globulina (A:G) de pacus alimentados por sete, 15 e 30 dias com níveis crescentes de SQ na dieta antes e depois do desafio com *Aeromonas hydrophila* (n=5).

VAR	TP	DES	Saponina de quilaia (mg kg ⁻¹)				
			0	100	200	300	400
ALB (g DL ⁻¹)	7	A	0,868 ±0,07 ^{Aa(C)}	0,827 ±0,06 ^{Aa(B)}	0,822 ±0,03 ^{Aa(B)}	0,835 ±0,06 ^{Aa(B)}	0,778 ±0,15 ^{Ab(B)}
		D	0,937 ±0,12 ^{Aa(a)}	0,852 ±0,14 ^{Aa(b)}	0,968 ±0,12 ^{Aa(a)}	0,968 ±0,18 ^{Aa(ab)}	0,991 ±0,13 ^{Aa(ab)}
	15	A	1,102 ±0,09 ^{Aa(A)}	0,904 ±0,09 ^{Bb(AB)}	0,893 ±0,08 ^{Ba(AB)}	1,201 ±0,20 ^{Aa(A)}	1,055 ±0,09 ^{ABa(A)}
		D	1,134 ±0,18 ^{Aa(a)}	1,118 ±0,02 ^{ABa(ab)}	0,981 ±0,09 ^{Ba(a)}	1,106 ±0,04 ^{ABa(a)}	1,126 ±0,08 ^{ABa(a)}
	30	A	0,987 ±0,08 ^{Aa(B)}	0,933 ±0,02 ^{Aa(A)}	0,977 ±0,03 ^{Aa(A)}	0,991 ±0,10 ^{Aa(B)}	0,948 ±0,12 ^{Aa(AB)}
		D	0,945 ±0,17 ^{ABa(a)}	1,238 ±0,36 ^{Aa(a)}	1,13 ±0,20 ^{ABa(a)}	0,831 ±0,09 ^{Bb(b)}	0,903 ±0,16 ^{Ba(b)}
	7	A	3,33 ±0,17 ^{ABb(A)}	3,17 ±0,19 ^{Bb(A)}	3,24 ±0,15 ^{ABb(A)}	3,43 ±0,08 ^{Aa(A)}	3,23 ±0,07 ^{ABb(A)}
		D	3,68 ±0,21 ^{Ba(a)}	3,98 ±0,03 ^{ABa(a)}	3,81 ±0,12 ^{ABa(a)}	3,68 ±0,21 ^{Ba(a)}	4,14 ±0,40 ^{Aa(a)}
PPT (g DL ⁻¹)	15	A	3,57 ±0,25 ^{Aa(A)}	3,05 ±0,30 ^{Bb(A)}	3,07 ±0,29 ^{Bb(A)}	3,31 ±0,31 ^{ABb(A)}	3,31 ±0,44 ^{ABa(A)}
		D	3,65 ±0,13 ^{ABa(a)}	3,76 ±0,18 ^{Aa(a)}	3,43 ±0,07 ^{Ba(b)}	3,71 ±0,17 ^{ABa(a)}	3,78 ±0,38 ^{Aa(a)}
	30	A	3,21 ±0,40 ^{Aa(A)}	3,24 ±0,13 ^{Aa(A)}	3,25 ±0,23 ^{Aa(A)}	3,24 ±0,31 ^{Aa(A)}	3,09 ±0,41 ^{Aa(A)}
		D	2,37 ±0,92 ^{Aa(b)}	2,14 ±0,28 ^{Ab(b)}	2,16 ±0,26 ^{Ab(c)}	1,99 ±0,12 ^{Ab(b)}	2,01 ±0,25 ^{Ab(b)}
	7	A	2,46 ±0,17 ^{Aa(A)}	2,32 ±0,16 ^{Ab(A)}	2,36 ±0,06 ^{Ab(A)}	2,54 ±0,16 ^{Aa(A)}	2,45 ±0,11 ^{Ab(A)}
		D	2,68 ±0,14 ^{Ba(a)}	3,17 ±0,15 ^{Aa(a)}	2,80 ±0,15 ^{ABa(a)}	2,65 ±0,32 ^{Ba(a)}	3,15 ±0,38 ^{Aa(a)}
	15	A	2,47 ±0,25 ^{Aa(A)}	2,07 ±0,27 ^{Ab(A)}	2,12 ±0,22 ^{Ab(A)}	2,19 ±0,26 ^{Ab(B)}	2,31 ±0,34 ^{Aa(A)}
		D	2,51 ±0,28 ^{Aa(a)}	2,64 ±0,17 ^{Aa(b)}	2,47 ±0,11 ^{Aa(b)}	2,63 ±0,17 ^{Aa(a)}	2,52 ±0,25 ^{Aa(b)}
GLO (g DL ⁻¹)	30	A	2,29 ±0,36 ^{Aa(A)}	2,33 ±0,12 ^{Aa(A)}	2,27 ±0,21 ^{Aa(A)}	2,25 ±0,24 ^{Aa(AB)}	2,14 ±0,31 ^{Aa(A)}
		D	1,04 ±0,10 ^{ABb(b)}	0,85 ±0,20 ^{Bb(c)}	1,07 ±0,09 ^{Ab(c)}	1,20 ±0,11 ^{Ab(b)}	1,18 ±0,11 ^{Ab(c)}
	7	A	0,342 ±0,03 ^{Aa(B)}	0,368 ±0,02 ^{Aa(B)}	0,326 ±0,03 ^{Aa(B)}	0,33 ±0,04 ^{Aa(B)}	0,321 ±0,09 ^{Aa(B)}
		D	0,343 ±0,05 ^{Aa(b)}	0,29 ±0,08 ^{Aa(b)}	0,36 ±0,05 ^{Aa(b)}	0,398 ±0,10 ^{Aa(b)}	0,319 ±0,06 ^{Aa(b)}
	15	A	0,451 ±0,06 ^{Ba(A)}	0,424 ±0,02 ^{Ba(A)}	0,422 ±0,02 ^{Ba(A)}	0,581 ±0,14 ^{Aa(A)}	0,459 ±0,04 ^{Ba(A)}
		D	0,461 ±0,12 ^{Aa(b)}	0,425 ±0,02 ^{Aa(b)}	0,381 ±0,05 ^{Aa(b)}	0,41 ±0,04 ^{Ab(b)}	0,43 ±0,06 ^{Aa(b)}
	30	A	0,435 ±0,05 ^{Ab(A)}	0,401 ±0,02 ^{Ab(AB)}	0,432 ±0,03 ^{Ab(A)}	0,443 ±0,04 ^{Ab(B)}	0,445 ±0,04 ^{Ab(A)}
		D	0,842 ±0,14 ^{Ba(a)}	1,562 ±0,70 ^{Aa(a)}	1,11 ±0,20 ^{ABa(a)}	0,72 ±0,10 ^{Ba(a)}	0,75 ±0,15 ^{Ba(a)}
A:G	7	A	0,342 ±0,03 ^{Aa(B)}	0,368 ±0,02 ^{Aa(B)}	0,326 ±0,03 ^{Aa(B)}	0,33 ±0,04 ^{Aa(B)}	0,321 ±0,09 ^{Aa(B)}
		D	0,343 ±0,05 ^{Aa(b)}	0,29 ±0,08 ^{Aa(b)}	0,36 ±0,05 ^{Aa(b)}	0,398 ±0,10 ^{Aa(b)}	0,319 ±0,06 ^{Aa(b)}
	15	A	0,451 ±0,06 ^{Ba(A)}	0,424 ±0,02 ^{Ba(A)}	0,422 ±0,02 ^{Ba(A)}	0,581 ±0,14 ^{Aa(A)}	0,459 ±0,04 ^{Ba(A)}
		D	0,461 ±0,12 ^{Aa(b)}	0,425 ±0,02 ^{Aa(b)}	0,381 ±0,05 ^{Aa(b)}	0,41 ±0,04 ^{Ab(b)}	0,43 ±0,06 ^{Aa(b)}
	30	A	0,435 ±0,05 ^{Ab(A)}	0,401 ±0,02 ^{Ab(AB)}	0,432 ±0,03 ^{Ab(A)}	0,443 ±0,04 ^{Ab(B)}	0,445 ±0,04 ^{Ab(A)}
		D	0,842 ±0,14 ^{Ba(a)}	1,562 ±0,70 ^{Aa(a)}	1,11 ±0,20 ^{ABa(a)}	0,72 ±0,10 ^{Ba(a)}	0,75 ±0,15 ^{Ba(a)}
	7	A	0,342 ±0,03 ^{Aa(B)}	0,368 ±0,02 ^{Aa(B)}	0,326 ±0,03 ^{Aa(B)}	0,33 ±0,04 ^{Aa(B)}	0,321 ±0,09 ^{Aa(B)}
		D	0,343 ±0,05 ^{Aa(b)}	0,29 ±0,08 ^{Aa(b)}	0,36 ±0,05 ^{Aa(b)}	0,398 ±0,10 ^{Aa(b)}	0,319 ±0,06 ^{Aa(b)}

VAR: Variáveis; TP – Tempo de alimentação; A: Antes do desafio com *Aeromonas hydrophila*, D: Depois do desafio com *Aeromonas hydrophila*. Médias ($\mu \pm$ DP) com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p>0,05$). Letras maiúsculas comparam concentrações de SQ no mesmo tempo e letras minúsculas comparam antes e depois do desafio. Letras maiúsculas entre parênteses comparam TP antes do desafio e letras minúsculas entre parênteses comparam TP depois do desafio.

Os valores hematológicos estão apresentados na Tabela 3. A porcentagem de hematócrito (%HCT) aumentou após o desafio em todos os peixes do tempo sete de alimentação, exceto os da dieta 300 mg kg⁻¹ de SQ. Os peixes que consumiram SQ por sete dias, apresentaram maior % de HCT antes do desafio e após o desafio o valor permaneceu maior apenas nos peixes do tratamento contendo 400 mg kg⁻¹ de SQ em comparação ao grupo controle. Todos os peixes que consumiram SQ por 15 dias apresentaram menor % de HCT antes do desafio, entretanto, depois do desafio os peixes dos tratamentos 100 e 200 mg kg⁻¹ de SQ apresentaram aumento. A ingestão de dietas contendo SQ por 30 dias influenciou no aumento da % de HCT antes do desafio, sendo que apenas os valores dos peixes das dietas 100 e 400 mg kg⁻¹ de SQ foram estatisticamente diferente daqueles do grupo controle. Antes do desafio, todos os peixes alimentados por 30 dias mostraram maiores % de HCT, independentes da inclusão de SQ. Após o desafio, em relação aos demais tempos, todos os peixes alimentados por 15 dias, apresentaram maior % de HCT, exceto os peixes da dieta 400 mg kg⁻¹, que apresentaram valores estatisticamente iguais em todos os tempos.

Só foi possível observar maior quantidade de eritrócitos (ERI) nos peixes das dietas 100 e 300 mg kg⁻¹ de SQ, alimentados por 30 dias, antes do desafio. Após o desafio, todos os peixes alimentados com SQ apresentaram menor número de ERI. Ainda nos peixes de 30 dias de alimentação, houve queda do número de ERI nos peixes do tratamento 100 mg kg⁻¹ de SQ após o desafio em relação a antes do desafio. Após o desafio, os peixes dos tratamentos 100, 200 e 300 mg kg⁻¹ de SQ, alimentados por sete e 30 dias, apresentaram menor número de ERI, exceto os peixes do tratamento controle e 400 mg kg⁻¹, que permaneceram com número estatisticamente igual de ERI em todos os tempos.

A maior concentração de hemoglobina (HB) foi observada nos peixes da dieta 400 mg kg⁻¹ de SQ, alimentados por 15 dias, entretanto, não diferiu estatisticamente do tratamento controle. Houve aumento da concentração de HB após o desafio nos peixes das dietas 100, 200 e 400 mg kg⁻¹ de SQ e mesmo tempo de alimentação. Antes do desafio, a maior concentração de HB foi observada nos peixes alimentados por 30 dias, independente do tratamento, e a

menor concentração nos peixes alimentados por 15 dias. Depois do desafio, os peixes da dieta 100 e 200 mg kg⁻¹, alimentados por sete dias, apresentaram menor concentração de HB em relação aos demais tempos.

O volume corpuscular médio (VCM) foi maior apenas nos peixes que consumiram 100 e 300 mg kg⁻¹ de SQ por sete dias, antes e depois do desafio, respectivamente. Antes do desafio, todos os peixes que consumiram SQ, por 15 dias, apresentaram menor VCM, entretanto, estes mesmos peixes apresentam aumento do VCM após o desafio, diferentemente do tratamento controle, o qual apresentou queda do VCM. Os maiores valores de VCM foram observados nos peixes alimentados por 30 dias, antes do desafio, independente do tratamento. Após o desafio, o menor valor foi observado nos peixes da dieta 400 mg kg⁻¹ SQ, com 30 dias de alimentação.

A hemoglobina corpuscular média (HCM) foi menor nos peixes que consumiram SQ, por 15 dias, antes do desafio, principalmente nos peixes da dieta 100 mg kg⁻¹ de SQ. Entretanto, após o desafio, os peixes dos tratamentos 100 e 400 mg kg⁻¹ de SQ apresentaram maior HCM. Antes do desafio, os peixes que consumiram as dietas contendo 100 e 300 mg kg⁻¹ de SQ apresentaram menor perfil de HCM, mas não houve diferença estatística em todos os tratamentos após o desafio. Os maiores valores de HCM foram observados nos peixes alimentados por 30 dias, antes do desafio, independente do tratamento, e os menores valores nos peixes alimentados por 15 dias, principalmente os das dietas 200, 300 e 400 mg kg⁻¹ de SQ. Após o desafio, apenas com alimentação por sete e 15 dias são observados os menores valores de HCM nos peixes das dietas 200 e 300 mg kg⁻¹ de SQ.

Os valores da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não apresentaram diferença estatística nos tratamentos e tempos de alimentação. No tempo de 15 de alimentação, ocorreram os menores valores de CHCM antes do desafio, independente do tratamento, enquanto no tempo 30 ocorreram os maiores valores de CHCM, após o desafio, independente da concentração de SQ na ração.

Tabela 3 – Porcentagem de hematócrito (HCT), concentração de eritrócitos (ERI), hemoglobina (HB), volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de pacus alimentados por sete, 15 e 30 dias com níveis crescentes de SQ na dieta antes e depois do desafio com *Aeromonas hydrophila* (n=5).

VAR	TP	DES	Saponina de quilaia (mg kg ⁻¹)														
			0		100		200		300		400						
HCT (%)	7	A	17,13	±0,9	Bb(B)	19,25	±1,0	ABb(B)	18,1	±1,7	ABb(B)	19,4	±1,5	Aa(B)	17,95	±1,7	ABb(C)
		D	20,83	±0,8	ABa(b)	20,38	±0,5	ABa(b)	21,2	±1,0	ABa(b)	19,63	±1,3	Ba(b)	21,9	±1,9	Aa(a)
	15	A	23,6	±1,7	Aa(A)	18,5	±3,1	Bb(B)	19,5	±2,4	Bb(B)	20	±1,0	Bb(B)	21,9	±1,3	ABb(B)
		D	25,63	±0,5	ABa(a)	26,5	±1,5	Aa(a)	26,5	±0,4	Aa(a)	24,7	±1,0	Ba(a)	25,38	±0,5	ABa(a)
	30	A	22,98	±2,3	Ba(A)	27,44	±1,4	Aa(A)	25,35	±3,5	ABa(A)	24,7	±1,9	ABa(A)	27,85	±2,0	Aa(A)
		D	19,44	±4,4	Aa(b)	17,75	±4,4	Ab(b)	23,88	±3,1	Aa(ab)	20,3	±4,9	Aa(ab)	20,8	±5,3	Ab(a)
ERI (x10 ⁶ mm ⁻³)	7	A	1,41	±0,2	Aa(A)	1,24	±0,2	Aa(b)	1,31	±0,2	Aa(b)	1,36	±0,2	Aa(B)	1,22	±0,1	Aa(B)
		D	1,56	±0,4	Aa(a)	1,58	±0,1	Aa(b)	1,43	±0,1	Aa(b)	1,3	±0,3	Aa(b)	1,65	±0,1	Aa(a)
	15	A	1,43	±0,0	Aa(A)	1,69	±0,0	Aa(A)	1,6	±0,2	Aa(A)	1,51	±0,1	Aa(AB)	1,72	±0,3	Aa(A)
		D	1,9	±0,1	Aa(a)	1,79	±0,1	Aa(a)	1,92	±0,2	Aa(a)	1,94	±0,0	Aa(a)	1,72	±0,3	Aa(a)
	30	A	1,22	±0,2	Ca(A)	1,65	±0,1	Aa(A)	1,35	±0,1	Bb(B)	1,59	±0,1	Aa(A)	1,5	±0,1	ABa(A)
		D	1,55	±0,3	Aa(a)	1,15	±0,1	Bb(c)	1,12	±0,3	Ba(b)	1,38	±0,2	ABa(b)	1,38	±0,1	ABa(a)
HB (g dL ⁻¹)	7	A	6,11	±0,6	Aa(B)	6,31	±0,5	Aa(B)	6,01	±0,3	Aa(B)	6,54	±0,7	Aa(B)	6,01	±0,1	Aa(B)
		D	7,33	±1,1	Aa(a)	7,31	±0,4	Aa(b)	6,61	±0,5	Aa(b)	6,4	±0,9	Aa(a)	7,24	±0,6	Aa(a)
	15	A	6,33	±1,1	Ab(B)	4,43	±0,1	Bb(C)	4,9	±0,6	Bb(C)	5,49	±0,5	ABa(C)	6,39	±0,3	Ab(B)
		D	8,15	±0,8	Aa(a)	7,73	±0,4	Aa(ab)	8,2	±0,3	Aa(a)	6,64	±1,3	Ba(a)	7,4	±0,3	ABa(a)
	30	A	7,95	±0,5	Aa(A)	9,18	±0,5	Aa(A)	9,08	±0,8	Aa(A)	9,4	±0,9	Aa(A)	9,22	±1,0	Aa(A)
		D	7,26	±1,7	Aa(a)	8,42	±0,7	Aa(a)	7,6	±0,8	Aa(a)	7,74	±2,3	Aa(a)	7,27	±1,7	Aa(a)
VCM (mm ⁻³)	7	A	128,07	±17,6	Ba(B)	154,32	±18,9	Aa(A)	138,7	±10,0	ABa(B)	144,2	±19,7	ABa(B)	147,35	±9,1	ABa(B)
		D	138,91	±22,4	Ba(a)	133,5	±10,7	Ba(a)	144,33	±17,3	Ba(a)	170,6	±18,3	Aa(a)	132,95	±13,5	Ba(ab)
	15	A	166,21	±23,4	Aa(AB)	111,85	±27,2	Bb(B)	113,65	±10,2	Bb(C)	135,69	±2,8	Ba(B)	119,82	±12,1	Ba(C)
		D	131,9	±5,9	Ab(a)	150,56	±5,7	Aa(a)	139,17	±13,8	Aa(a)	132,5	±10,2	Aa(a)	148,24	±25,2	Aa(a)
	30	A	187,67	±42,7	Aa(A)	148	±21,3	Aa(A)	191,1	±13,3	Aa(A)	183,21	±7,2	Aa(A)	169,12	±20,1	Aa(A)
		D	139,89	±52,1	Aa(a)	139,74	±40,6	Aa(a)	185,17	±82,7	Aa(a)	148,68	±39,6	Aa(a)	101,66	±35,9	Aa(b)
HCM (mg)	7	A	48,02	±11,8	Aa(B)	51,74	±6,4	Aa(A)	48,94	±7,4	Aa(B)	48,69	±8,3	Aa(B)	47,88	±2,9	Aa(B)
		D	44,57	±5,0	Aa(a)	47,31	±1,9	Aa(a)	44,86	±4,9	Aa(b)	46,77	±3,3	Aa(ab)	43,99	±4,6	Aa(a)
	15	A	44	±4,3	Aa(B)	24,47	±2,3	Bb(B)	28,93	±1,5	Bb(C)	35,3	±3,1	Bb(C)	37,13	±8,4	ABa(C)
		D	42,84	±4,4	ABa(a)	44,83	±2,7	Aa(a)	43	±3,9	ABa(b)	35,7	±7,5	Ba(b)	45,34	±6,1	Aa(a)
	30	A	68,53	±8,2	Aa(A)	56,08	±6,1	Ba(A)	67,09	±2,4	Aa(A)	58,45	±4,3	Ba(A)	61,59	±3,8	ABa(A)
		D	52,05	±18,6	Aa(a)	61,81	±18,1	Aa(a)	64,72	±15,3	Aa(a)	56,5	±18,2	Aa(a)	53,44	±15,4	Aa(a)
CHCM (g dL ⁻¹)	7	A	37,14	±5,4	Aa(A)	33,55	±1,4	Aa(B)	35,2	±4,0	Aa(A)	34,92	±1,2	Aa(A)	31,77	±1,1	Aa(B)
		D	34,87	±2,2	Aa(ab)	33,86	±1,5	Aa(b)	31,15	±1,7	Aa(b)	31,19	±2,4	Aa(b)	33,1	±1,5	Aa(b)
	15	A	27,12	±6,1	Aa(B)	26,1	±0,6	Aa(C)	25,15	±2,2	Aa(B)	27,39	±1,8	Aa(C)	28,34	±1,0	Aa(B)
		D	32,43	±2,3	Aa(b)	29,81	±1,1	Aa(b)	31,15	±0,9	Aa(b)	31,19	±5,3	Aa(b)	33,1	±2,0	Aa(b)
	30	A	35,15	±2,9	Aa(A)	38,39	±2,5	Aa(A)	35,28	±3,2	Aa(A)	31,7	±2,7	Aa(B)	36,9	±5,5	Aa(A)
		D	37,33	±2,2	Aa(a)	44,33	±3,8	Aa(a)	43,28	±4,7	Aa(a)	37,75	±4,5	Aa(a)	48,58	±17,3	Aa(a)

VAR: Variáveis; TP – Tempo de alimentação; A: Antes do desafio com *Aeromonas hydrophila*, D: Depois do desafio com *Aeromonas hydrophila*. Médias ($\mu \pm DP$) com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p>0,05$). Letras maiúsculas comparam concentrações de SQ no mesmo tempo e letras minúsculas comparam antes e depois do desafio. Letras maiúsculas entre parênteses comparam TP antes do desafio e letras minúsculas entre parênteses comparam TP depois do desafio.

3.3. Parâmetros Imunológicos

3.3.1. Atividade respiratória de leucócitos e concentração de lisozima sérica

A SQ aumentou a atividade respiratória dos leucócitos (ARL), nos peixes alimentados por sete dias, com as dietas 100 e 200 mg kg⁻¹ de SQ sem o desafio, mas reduziu após 15 dias recebendo as dietas 100, 200 e 300 mg kg⁻¹ de SQ (Tabela 4). Após 30 dias de alimentação, as flutuações observadas na ARL não tem um padrão definido, e só há diferença significativa entre os tratamentos, sendo que o de 100 mg kg⁻¹ de SQ tem maior atividade, mas sem diferença em relação ao controle. Após o desafio, no grupo controle, a atividade cai com sete dias de alimentação, aumenta após 15 dias e não muda após 30 dias. Esse perfil é igual em todos os outros tratamentos (exceto o 300 mg kg⁻¹ de SQ), mostrando que a SQ não afetou a atividade dos leucócitos frente ao desafio com a bactéria, em nenhuma das concentrações testadas. Aos 15 dias de alimentação, antes do desafio, observou-se a menor ARL, principalmente nos tratamentos 200, 300 e 400 mg kg⁻¹ de SQ.

A concentração sérica de lisozima (LIZ) está apresentada na Tabela 4. Apenas a alimentação com SQ, por sete dias, não alterou a concentração de lisozima, mas aumentou quando as dietas 100 e 200 mg kg⁻¹ de SQ foram oferecidas por 15 dias e a dieta 100 mg kg⁻¹ de SQ por 30 dias. Seguindo o mesmo perfil da ARL, após sete dias de alimentação, a concentração da lisozima foi reduzida após o desafio bacteriano, independente da concentração de SQ. Após 15 dias, este perfil se inverteu nos tratamentos controle e 400 mg kg⁻¹ de SQ, sem diferença nos outros grupos. Aos 30 dias de alimentação, antes do desafio, todos os peixes apresentaram menor concentração de LIZ, em comparação aos demais tempos. Entretanto, os peixes que consumiram 100 mg kg⁻¹ de SQ por sete e 15 dias mantiveram concentrações aumentadas de LIZ diferentemente dos demais tratamentos. Após 30 dias de alimentação, as amostras de soro dos peixes em desafio foram insuficientes para as análises.

Tabela 4 – Atividade respiratória de leucócitos (ARL) e a concentração de lisozima sérica (LIZ) de pacus alimentados por sete, 15 e 30 dias com níveis crescentes de SQ na dieta antes e depois do desafio com *Aeromonas hydrophila* (n=5).

VAR	TP	DES	Tratamento				
			Saponina de quilaia (mg kg ⁻¹)				
			0	100	200	300	400
ARL (DO a 540 nm)	7	A	0,212 ±0,02 ^{Ca(B)}	0,356 ±0,14 ^{ABa(A)}	0,427 ±0,02 ^{Aa(A)}	0,248 ±0,01 ^{Ca(B)}	0,265 ±0,01 ^{Bca(B)}
		D	0,171 ±0,02 ^{Cb(b)}	0,193 ±0,01 ^{ABb(b)}	0,197 ±0,01 ^{Ab(b)}	0,174 ±0,01 ^{Cb(c)}	0,180 ±0,01 ^{BCb(b)}
	15	A	0,193 ±0,01 ^{Ab(B)}	0,169 ±0,01 ^{Bb(B)}	0,171 ±0,01 ^{Bb(C)}	0,175 ±0,00 ^{Bb(C)}	0,198 ±0,01 ^{Ab(C)}
		D	0,315 ±0,02 ^{Ba(a)}	0,313 ±0,01 ^{Ba(a)}	0,339 ±0,01 ^{ABa(a)}	0,347 ±0,01 ^{Aa(a)}	0,314 ±0,03 ^{Ba(a)}
	30	A	0,303 ±0,01 ^{ABa(A)}	0,306 ±0,00 ^{Ab(A)}	0,300 ±0,02 ^{ABa(B)}	0,304 ±0,01 ^{ABa(A)}	0,287 ±0,01 ^{Ba(A)}
		D	0,327 ±0,06 ^{Aa(a)}	0,321 ±0,00 ^{Aa(a)}	0,326 ±0,07 ^{Aa(a)}	0,298 ±0,01 ^{Aa(b)}	0,303 ±0,01 ^{Aa(a)}
LIZ (ng/μL)	7	A	10,43 ±1,14 ^{Aa(A)}	10,35 ±1,18 ^{Aa(A)}	10,78 ±1,58 ^{Aa(A)}	11,45 ±1,38 ^{Aa(A)}	9,93 ±0,87 ^{Aa(A)}
		D	5,99 ±0,62 ^{Ab(b)}	5,83 ±0,56 ^{Ab(b)}	6,16 ±0,63 ^{Ab(b)}	6,81 ±1,11 ^{Ab(b)}	6,45 ±0,53 ^{Ab(b)}
	15	A	7,74 ±1,07 ^{Bb(B)}	9,49 ±1,51 ^{Aa(A)}	9,39 ±0,31 ^{Aa(B)}	8,41 ±0,72 ^{ABa(B)}	7,38 ±1,08 ^{Bb(B)}
		D	10,79 ±0,61 ^{Aa(a)}	9,70 ±0,24 ^{Aa(a)}	9,71 ±1,56 ^{Aa(a)}	9,62 ±0,92 ^{Aa(a)}	10,28 ±0,45 ^{Aa(a)}
	30	A	2,99 ±0,22 ^{B(C)}	3,67 ±0,57 ^{A(B)}	3,5 ±0,29 ^{AB(C)}	3,14 ±0,33 ^{AB(C)}	3,40 ±0,15 ^{AB(C)}
		D					

VAR: Variáveis; TP – Tempo de alimentação; A: Antes do desafio com *Aeromonas hydrophila*, D: Depois do desafio com *Aeromonas hydrophila*. Médias ($\mu \pm$ DP) com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p>0,05$). Letras maiúsculas comparam concentrações de SQ no mesmo tempo e letras minúsculas comparam antes e depois do desafio. Letras maiúsculas entre parênteses comparam TP antes do desafio e letras minúsculas entre parênteses comparam TP depois do desafio.

3.3.2. Contagem total e diferencial de leucócitos

Após sete dias de alimentação, o número de linfócitos diminuiu em todas as concentrações de SQ, e após 15 dias, a diminuição só não é observada nas dietas controle e 400 mg kg⁻¹ SQ. Após 30 dias de alimentação não há diferença entre tratamentos (Tabela 5). Após o desafio com a bactéria, nos peixes que consumiram SQ por sete dias, ocorreu aumento do número dos linfócitos nos peixes do tratamento com 400 mg kg⁻¹ de SQ, sem diferença significativa nos outros grupos que receberam SQ. Com 15 dias de alimentação, o número dos linfócitos aumentou após o desafio bacteriano, exceto na dieta com 400 mg kg⁻¹ de SQ, em que não há diferença. Com 30 dias, o perfil de aumento é semelhante, mas o aumento é apenas numérico sem diferença significativa. Não foi possível observar efeito da saponina no aumento dos linfócitos circulantes. O aumento só ocorreu pela presença da bactéria.

Como mostra a Tabela 5, após alimentação de sete dias, observa-se apenas aumento no número de neutrófilos quando se analisa desafio bacteriano dos peixes da dieta 400 mg kg⁻¹. Com 15 dias de alimentação, o número de neutrófilos aumentou significativamente após o desafio bacteriano apenas nos peixes do grupo controle. Com 30 dias, estes efeitos desaparecem.

Ainda na Tabela 5, é apresentado o número de monócitos circulantes nos pacus alimentados com SQ e desafiados com *Aeromonas hydrophila*. A SQ reduz significativamente o número de monócitos nos peixes que receberam SQ por sete dias. Já, por 15 dias, nenhum tratamento difere significativamente. Com a alimentação por 30 dias, a menor quantidade de monócitos é encontrada nos peixes que consumiram 400 mg kg⁻¹ de SQ. Após o desafio com a bactéria, o número de monócitos circulantes aumentou significativamente apenas nos pacus alimentados com 100 mg kg⁻¹ de SQ, por 15 dias. Com 30 dias de alimentação, não houve diferença no número de monócitos circulantes em nenhum grupo de peixe, após o desafio bacteriano.

Com sete dias de alimentação, o número de eosinófilos foi mais elevado apenas nos peixes do tratamento controle (Tabela 5). Com 15 e 30 dias, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os tratamentos. O desafio bacteriano

elevou o número de eosinófilos no grupo de peixes que consumiu 100 mg kg^{-1} de SQ, por sete dias. Este perfil de aumento também foi observado nos peixes que receberam 200 mg kg^{-1} de SQ, mas sem significância estatística. Com 15 dias de alimentação, e após o desafio, o número de eosinófilos caiu apenas no grupo controle. Nos peixes que foram desafiados após 30 dias de consumo das dietas, observa-se queda no número de eosinófilos apenas na dieta 200 mg kg^{-1} de SQ.

Em relação ao número de trombócitos (Tabela 5), após sete dias de alimentação com SQ, os valores foram mais baixos no grupo alimentado com 400 mg kg^{-1} de SQ, ao contrário do que se observou com 15 e 30 dias de alimentação com SQ, quando os maiores valores aparecem nesse mesmo grupo de peixes. Em relação ao desafio bacteriano, com sete dias de alimentação de SQ, o número de trombócitos mostrou uma redução nos grupos controle, 100 e 300 mg kg^{-1} de SQ, enquanto que, com 15 dias, ocorreu aumento no grupo controle e 100 mg kg^{-1} de SQ e redução no grupo que recebeu 400 mg kg^{-1} de SQ. Após 30 dias de alimentação com SQ, houve aumento do número de trombócitos no grupo controle e redução significativa nos grupos 100 e 400 mg kg^{-1} de SQ. Nos outros dois grupos que receberam SQ (200 e 300 mg kg^{-1} de SQ) também se observou redução, mas sem diferença estatística. Com 15 dias de alimentação, os peixes de todos os tratamentos apresentaram maior quantidade de trombócitos em comparação com os demais tempos, depois do desafio, exceto pelos peixes do grupo 400 mg kg^{-1} , os quais permaneceram com número estatisticamente igual de trombócitos em todos os tempos.

Tabela 5 – Número de linfócitos (LIN); número de neutrófilos (NEU), número de monócitos (MON), número de eosinófilos (EOS) e o número de trombócitos (TRO) de pacus alimentados por sete, 15 e 30 dias com níveis crescentes de SQ na dieta antes e depois desafio com *Aeromonas hydrophila* (n=5).

VAR	TP	DES	Saponina de quilaia (mg kg ⁻¹)									
			0		100		200		300		400	
LIN 10 ³ (μL ⁻¹)	7	A	67,16 ±41,21	Aa(A)	39,23 ±13,13	ABa(A)	22,52 ±8,59	Ba(A)	33,78 ±20,68	Ba(A)	11,99 ±4,88	Bb(B)
		D	34,05 ±13,36	Aa(a)	24,32 ±7,10	Aa(b)	23,53 ±12,10	Aa(a)	22,99 ±4,99	Aa(a)	25,16 ±3,24	Aa(b)
	15	A	30,87 ±10,68	AB(B)	29,04 ±13,43	ABb(A)	22,25 ±9,17	BBb(A)	14,00 ±4,12	Bb(A)	37,92 ±12,87	Aa(A)
		D	56,36 ±12,90	ABa(a)	67,01 ±4,36	Aa(a)	35,89 ±4,24	BCa(a)	42,62 ±16,90	BCa(a)	29,63 ±21,14	Ca(b)
	30	A	20,10 ±12,87	Aa(B)	23,04 ±14,91	Aa(A)	23,69 ±10,39	Aa(A)	33,86 ±26,49	Aa(A)	30,99 ±10,42	Aa(A)
		D	46,96 ±27,40	Aa(A)	59,24 ±30,77	Aa(a)	44,36 ±22,76	Aa(a)	48,80 ±45,30	Aa(a)	74,01 ±50,43	Aa(a)
NEU 10 ³ (μL ⁻¹)	7	A	0,68 ±0,18	ABa(A)	1,41 ±1,37	Aa(A)	0,41 ±0,18	ABa(A)	0,79 ±0,57	ABa(A)	0,23 ±0,25	Bb(A)
		D	0,52 ±0,52	Aa(ab)	0,83 ±0,73	Aa(a)	0,51 ±0,26	Aa(a)	0,37 ±0,36	Aa(a)	0,61 ±0,14	Aa(a)
	15	A	0,00 ±0	Bb(B)	0,00 ±0	Ba(B)	0,09 ±0,12	ABa(B)	0,18 ±0,17	Aa(B)	0,00 ±0	Ba(A)
		D	0,70 ±0,46	ABa(a)	0,00 ±0	Ba(b)	0,16 ±0,19	ABa(b)	0,23 ±0,27	ABa(a)	0,83 ±0,75	Aa(a)
	30	A	0,14 ±0,13	Aa(B)	0,16 ±0,22	Aa(AB)	0,24 ±0,17	Aa(AB)	0,23 ±0,27	Aa(AB)	0,23 ±0,32	Aa(A)
		D	0,00 ±0	Bb(b)	0,05 ±0,10	ABa(b)	0,00 ±0	Bb(b)	0,00 ±0	Ba(a)	0,24 ±0,31	Aa(a)
MON 10 ³ (μL ⁻¹)	7	A	1,66 ±0,09	Aa(A)	0,52 ±0,39	Ba(A)	0,44 ±0,34	Ba(A)	0,35 ±0,37	Ba(A)	0,77 ±0,11	Ba(A)
		D	0,80 ±0,69	Aa(a)	0,47 ±0,18	Aa(a)	1,12 ±0,65	Aa(a)	0,57 ±0,43	Aa(a)	0,99 ±0,38	Aa(a)
	15	A	1,44 ±0,59	Aa(A)	0,48 ±0,43	AB(A)	0,58 ±0,23	Aa(A)	0,81 ±0,27	Aa(A)	1,37 ±1,82	Aa(A)
		D	1,71 ±0,25	Aa(a)	2,08 ±0,27	Aa(a)	1,10 ±1,09	Aa(a)	1,29 ±1,08	Aa(a)	2,15 ±0,86	Aa(a)
	30	A	0,53 ±0,41	ABa(B)	1,57 ±1,11	Aa(A)	0,63 ±0,86	ABa(A)	0,85 ±0,41	ABa(A)	0,20 ±0,40	Ba(A)
		D	1,08 ±0,76	Aa(a)	2,17 ±2,21	Aa(a)	1,54 ±1,11	Aa(a)	1,74 ±0,90	Aa(a)	2,43 ±2,27	Aa(a)
EOS 10 ³ (μL ⁻¹)	7	A	2,66 ±1,21	Aa(A)	0,91 ±0,65	Bb(A)	1,21 ±1,01	ABa(A)	2,28 ±1,28	ABa(A)	1,45 ±0,66	ABa(A)
		D	1,94 ±0,60	Aa(a)	2,33 ±0,86	Aa(a)	1,95 ±2,06	Aa(a)	0,73 ±0,72	Aa(a)	0,97 ±0,69	Aa(a)
	15	A	2,50 ±0,77	Aa(A)	1,84 ±1,77	Aa(A)	2,04 ±1,61	Aa(A)	0,87 ±0,60	Aa(A)	1,76 ±1,13	Aa(A)
		D	0,96 ±1,12	ABb(a)	1,56 ±0,42	Aa(a)	1,66 ±0,53	Aa(a)	0,27 ±0,54	Ba(a)	1,10 ±0,91	ABa(a)
	30	A	0,91 ±0,52	Aa(B)	1,53 ±0,32	Aa(A)	0,66 ±0,10	Aa(A)	1,51 ±1,12	Aa(A)	1,49 ±0,34	Aa(A)
		D	1,83 ±1,60	ABa(a)	2,13 ±1,45	Aa(a)	0,42 ±0,42	Ba(a)	1,29 ±1,07	ABa(a)	0,78 ±0,70	ABa(a)
TRO 10 ³ (μL ⁻¹)	7	A	31,61 ±2,55	Aa(A)	24,36 ±4,13	ABa(B)	24,31 ±8,00	ABa(A)	26,01 ±12,45	Aa(A)	14,84 ±3,14	Bb(B)
		D	15,69 ±9,1	ABb(b)	15,80 ±6,74	ABb(b)	19,76 ±2,54	ABa(b)	11,08 ±4,80	Bb(b)	21,41 ±3,05	Aa(a)
	15	A	25,12 ±5,43	Bb(B)	38,22 ±1,87	ABb(A)	28,29 ±7,70	Ba(A)	29,66 ±8,35	Ba(A)	51,29 ±19,82	Aa(A)
		D	37,38 ±6,72	ABa(a)	48,34 ±4,36	Aa(a)	39,66 ±18,96	Aa(a)	35,64 ±6,06	ABa(a)	23,74 ±2,59	Bb(a)
	30	A	11,74 ±4,64	Bb(C)	28,94 ±5,82	Ba(B)	20,08 ±6,82	Ba(A)	32,99 ±12,14	ABa(A)	53,50 ±27,96	Aa(A)
		D	29,37 ±12,10	Aa(a)	15,83 ±8,86	Ab(b)	16,20 ±10,70	Aa(b)	18,19 ±8,51	Aa(b)	19,04 ±7,82	Ab(a)

VAR: Variáveis; TP – Tempo de alimentação; A: Antes do desafio com *Aeromonas hydrophila*, D: Depois do desafio com *Aeromonas hydrophila*. Médias (μ ± DP) com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (p>0,05). Letras maiúsculas comparam concentrações de SQ no mesmo tempo e letras minúsculas comparam antes e depois do desafio. Letras maiúsculas entre parênteses comparam TP antes do desafio e letras minúsculas entre parênteses comparam TP depois do desafio.

3.4. Sobrevivência e sinais clínicos

Ao analisar a resposta dos peixes ao desafio com *Aeromonas hydrophila*, observou-se aumento da sobrevivência dos peixes com o maior tempo de condução do experimento (30 dias), sugerindo que a sobrevivência aumenta com o maior tempo de alimentação (Figura 1). Apenas os peixes que receberam 200 mg kg⁻¹ de SQ por sete dias apresentaram sobrevivência similar à observada com 30 dias de alimentação. Com 15 dias de consumo da dieta, não houve mortalidade.

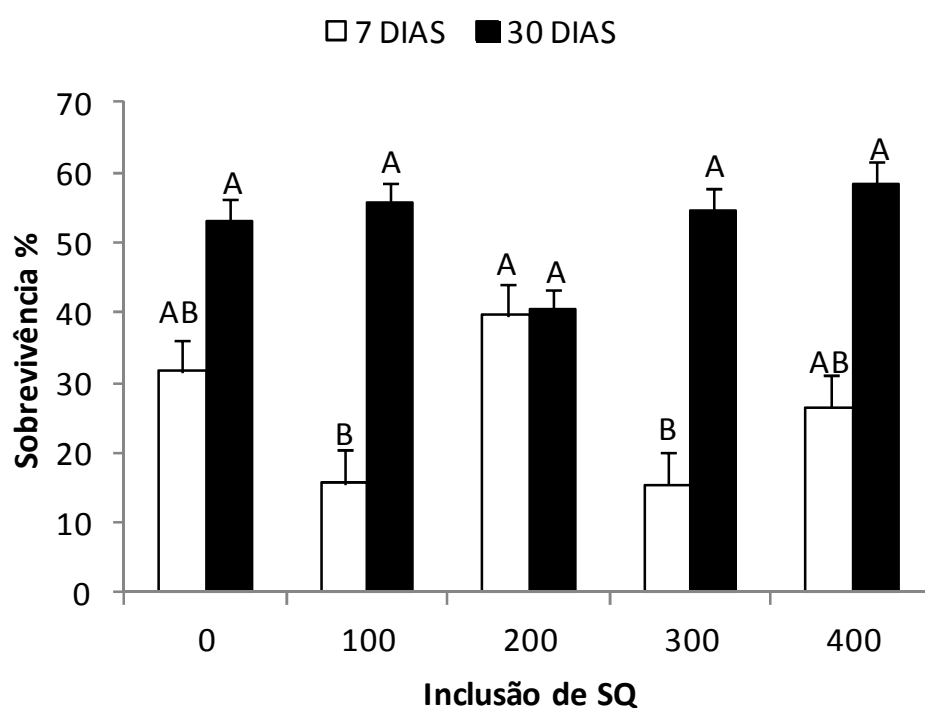


Figura 1 - Sobrevivência pacus alimentados por sete e 30 dias com níveis crescentes de SQ na dieta depois do desafio com *Aeromonas hydrophila* (n=5). Médias ($\mu \pm EP$) com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

Os sinais clínicos observados em todos os peixes desafiados, alimentados por sete e 30 dias com SQ, foram: natação errática, anorexia, presença de petéquias e equimose na superfície da pele e hemorragia nas brânquias, nadadeiras corroídas e distensão abdominal (Figura 2).

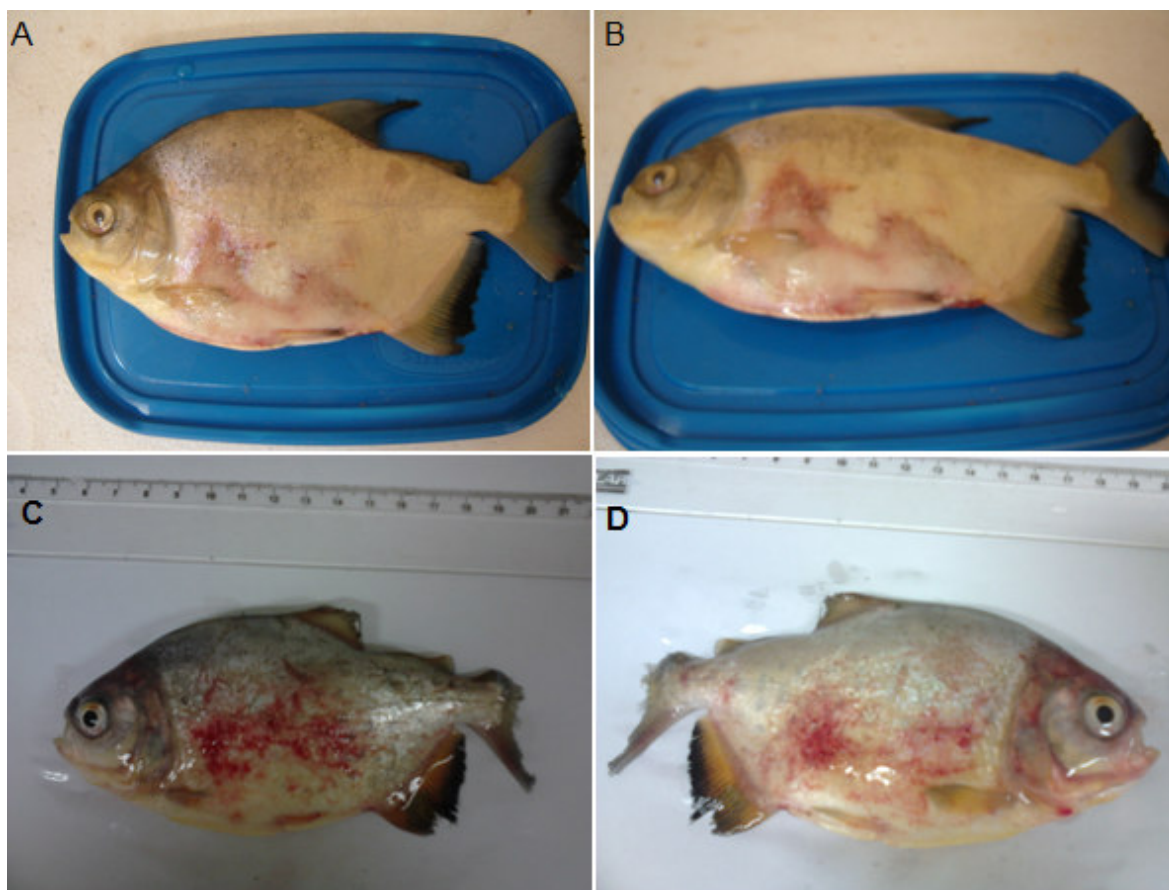


Figura 2- Sinais clínicos externos observados em juvenis de pacus alimentados aos sete e 30 dias com níveis crescentes de inclusão de SQ na dieta durante seis dias após inoculação intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila*. **A e B** – mesmo peixe com distensão abdominal; **C e D** – Nadadeiras corroídas, petéquias e equimose na superfície da pele.

4.0. DISCUSSÃO

A sobrevivência foi maior nos peixes que consumiram 200 mg kg^{-1} de SQ após o desafio bacteriano do tempo sete dias, porém aos 30 dias de consumo das dietas, a sobrevivência não foi influenciada pelo consumo de SQ. Os sinais clínicos observados após o desafio são semelhantes aos manifestados por pacus

infectados por *A. hydrophila* no trabalho de Garcia & Moraes (2009) e o quadro de anorexia é caracterizado pela diminuição da concentração de glicose plasmática após o desafio.

Nos primeiros dias de administração das dietas contendo SQ foi possível observar a ativação de mecanismos de defesa não específicos do pacu pelo aumento da atividade respiratória de leucócitos (ARL). Este fato também foi observado por Christyapita et al. (2007), verificaram que o consumo de extrato de folhas de *Eclipta alba* aumentou a resposta de variáveis não específicas do sistema imune de tilápias antes de desafio bacteriano. Este tipo de resposta antes da exposição dos peixes ao patógeno pode estar relacionado ao reconhecimento de estruturas de padrão molecular associado ao patógeno, conhecido como PAMP. Rieger & Barreda (2011) afirmaram que a ARL em peixes pode ser ativada pelos PAMP's. Essas estruturas assemelham-se as de agentes patogênicos, tais como lipopolisacarídeos (LPS), peptidoglicanos, a lectina, a proteína C-reativa, receptor de manose e β -1,3-glucanos entre outros (Whyte, 2007). Como a SQ possui em sua estrutura diversas substâncias (Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007) é possível que alguma (ou sua combinação com outras) esteja funcionando como um PAMP neste caso. Entretanto, a modulação não ocorreu em nenhum peixe que consumiu qualquer concentração de SQ na dieta após 30 dias de alimentação. Matsuo & Miyazano (1993) e Yoshida et al. (1995) relatam a relação entre a resposta do imunoestimulante e o tempo de administração do mesmo via oral em peixes. Em alguns casos, quanto menor o tempo de consumo, maior é a resposta dos parâmetros inatos.

A determinação da concentração de lisozima sérica é outro indicador potencial para medir a imunidade inata do peixe (Saurabh & Sahoo, 2008; Tort et al., 2011). Como em mamíferos, a lisozima em peixes é produzida principalmente em neutrófilos, monócitos e menos significativamente em macrófagos, demonstrando, dessa maneira, a importância dessa enzima para os mecanismos de defesa imunológica dos peixes (Lie et al., 1989; Saurabh & Sahoo, 2008). Essa associação com as células de defesa do sistema imune, segundo Lie et al. (1989), indica que a enzima contribui na primeira linha de defesa contra doenças infecciosas e os imunoestimulantes também podem aumentar a síntese de

proteína para produzir mais moléculas envolvidas na imunidade inata, como a lisozima. No presente estudo, assim como em outros que utilizaram compostos vegetais, os parâmetros do sistema imune não específico mudaram conforme o tempo de administração da SQ aos pacus. Aos 15 dias, a concentração de lisozima antes do desafio foi maior em pacus que se alimentaram de dietas com 100 e 200 mg kg⁻¹ de SQ e aos 30 dias com dietas contendo 100 mg kg⁻¹ de SQ. A suplementação de quitina, quitosana e levamisol em dietas para carpas aumentou a concentração de lisozima (Gopalakannan & Arul, 2006). Ardó et al. (2008) relataram o aumento da ARL e da atividade fagocítica das células do sistema imune antes e depois do desafio por *Aeromonas hydrophila* em tilápias que consumiram dois tipos de extratos vegetais (*Astragalus membranaceus* e *Lonicera japonica*). Assim como no presente estudo, estes autores verificaram aumento na ARL e da lisozima em diferentes tempos de administração das dietas, na primeira e na terceira semana após o consumo, respectivamente. Christyapita et al. (2007), Yin et al. (2006) e Jian & Wu (2004) também relacionaram a resposta de parâmetros da imunidade inata de tilápias e carpas, respectivamente, com o tempo de administração de dietas a base de extratos vegetais. Como não há memória das células do sistema inato de peixes, a duração de sua resposta é sempre mais curta do que no sistema imune específico (Anderson, 1992; Sakai, 1999) por isso deve-se administrar o imunoestimulante antes da exposição ao patógeno ou situação estressante.

Os componentes da imunidade inata são constituídos pelo epitélio, células da circulação, tecidos e algumas proteínas plasmáticas (Abbas & Lichtman, 2004). Dentre eles, estão a concentração de lisozima, albumina, globulina e demais atividades a nível celular (Misra et al., 2006). No presente estudo, a SQ pode ter promovido o aumento da concentração da proteína sérica total após o desafio nos grupos de peixes que receberam 100 e 400 mg kg⁻¹ de SQ por 15 dias, e os que receberam 400 mg kg⁻¹ de SQ por sete dias, respectivamente. Entretanto, a maior concentração de globulina foi observada após o desafio pelos peixes que consumiram 400 mg kg⁻¹ de SQ por sete dias, demonstrando que esta foi a maior parte da produção de proteína total.

Enquanto isso, a albumina e a relação A:G foi bastante elevada após o desafio apenas no grupo que consumiu 100 mg kg⁻¹ de SQ por 30 dias. Entre as proteínas séricas, a albumina e a globulina são as frações mais abundantes da proteína total e possuem função significativa na resposta imune. A globulina por causa das gamaglobulinas, que contém todas as imunoglobulinas no sangue (Misra et al., 2006; Goda, 2008; Maqsood et al., 2009). A albumina, além de ser constituinte da maior fração de proteína no sangue de vertebrados (cerca de 55%), também é composta por diversos aminoácidos produzidos pelo fígado, os quais são responsáveis por diversas funções, como regulador da pressão osmótica, transportador de lipídios e hormônios, entre outras (Gray & Doolittle, 1992).

A relação A:G demonstra a concentração entre as duas maiores frações da proteína total, enquanto a menor relação A:G revela baixa concentração da albumina em comparação com a globulina, o que pode estar relacionado com a redução do estado nutricional e principalmente a saúde do animal, como a presença de infecção/inflamação (Rao et al., 2006), assim como maior produção de imunoglobulinas.

O aumento da proteína sérica também pode estar relacionado a atividade de outras proteínas presente na circulação sanguínea, como as citocinas, lectinas, proteína C-reativa, entre outros (Abbas & Lichtman, 2004), os quais não foram avaliados neste estudo. Siwicki et al. (1994) observaram aumento dos parâmetros de proteína total em trutas alimentadas com diversos imunoestimulantes. Dügenci et al. (2003) verificaram que alguns extratos vegetais também aumentaram a proteína total da maioria dos peixes tratados. Isso pode ter sido ocasionado pela presença de saponina, pois se sabe que os extratos vegetais possuem diversas substâncias benéficas, incluindo as saponinas, que podem atuar como imunoestimulantes em peixes (Harikrishnan et al., 2011). Ao administrarem a erva *Achyranthes aspera* em dietas para peixes *Labeo rohita* e desafiá-los com *Aeromonas hydrophila*, Rao et al. (2006) registraram o aumento de diversas variáveis imunológicas não específica. Estes autores relataram que a albumina e a relação A:G foram significativamente maiores em *Labeo rohita* tratados com sementes da planta *Achyranthes aspera* em relação ao grupo controle, enquanto

a concentração de globulina e proteína total foi ligeiramente maior. A incorporação do extrato da raiz de *A. aspera* nas dietas também aumentou os níveis de globulina e proteína sérica em *L. rohita* (Rao et al., 2004).

No presente estudo, a albumina aumentou nos peixes que consumiram 100 mg kg⁻¹ SQ na dieta por 30 dias, sendo maior comparado com os demais tratamentos desafiados com *Aeromonas hydrophila*. Relação similar foi encontrada por Maqsood et al. (2009) quando suplementaram levamisol nas dietas para carpa comum (*Cyprinus carpio*) e as desafiaram com *Aeromonas hydrophila*. Estes autores observaram aumento da albumina nestes peixes antes e depois do desafio em comparação ao tratamento sem levamisol.

A avaliação de parâmetros hematológicos é outra ferramenta importante para o diagnóstico e o estado de saúde dos peixes (Rehulka, 2002). A maioria dos valores do eritrograma dos peixes deste estudo, como hematócrito, eritrócito e hemoglobina estão abaixo dos valores encontrados por Ranzani-Paiva et al. (1999) para a espécie, exceto em alguns casos como para a hemoglobina, quando os tratamentos com maiores tempos, apresentaram-se valores dentro do valor esperado para a espécie. Estes dados demonstram um quadro de anemia microcítica normocrômica (pelo valor normal do HB), entretanto a anemia provavelmente foi causada pelo volume das células, evidenciado pelo VCM diminuído, e não pela quantidade de hemoglobina, que se encontra com valores normais para a espécie (Ranzani-Paiva et al., 1999). Apesar disso, os demais índices eritrocitários, HCM e CHCM, permaneceram próximos aos valores encontrados por estes autores. Acredita-se que possa ter ocorrido uma hemodiluição ou hemoconcentração por disfunção osmorregulatória (Wedemeyer, 1996; Houston et al., 1996).

Embora seja normal a ocorrência de quadro anêmico nos animais pós-desafio, neste estudo, apenas após 30 dias de alimentação com SQ, pode-se observar a diminuição do hematócrito dos peixes dos tratamentos 100 e 400 mg kg⁻¹ de SQ, sugerindo um quadro de anemia. Assim também pelo número de eritrócitos no mesmo tempo, que reduziram em todos os peixes que consumiram SQ. Em peixes, os eritrócitos são as células mais abundantes na circulação. Estas são nucleadas e metabolicamente mais ativas do que as de mamíferos

(Hrubec & Smith, 2010). Como em mamíferos, a principal função dos eritrócitos é o transporte de oxigênio e gás carbônico por meio da combinação da hemoglobina com o O₂ formando oxihemoglobina, nos órgãos respiratórios, ocorrendo posterior troca pelo CO₂ tecidual (Ranzani-Paiva, 2007; apud Tavares-Dias et al., 2009). Provavelmente essa anemia foi causada pelo sequestro de sangue, congestão hemorrágica ou perda de eritrócitos por hemólise provocada pela bacteriose (Bruno & Munro, 1986; Biller, 2008; Garcia & Moares, 2009). Carpas comum infectadas por *A. hydrophila*, que foram tratadas com extratos herbais, apresentaram significativa diminuição no hematócrito e hemoglobina nos primeiros 10 dias de infecção até obterem níveis normais após 30 dias (Harikrishnan et al., 2003). Entretanto, nos demais tempos de alimentação, sete e 15 dias, o número de eritrócitos não variou estatisticamente e o aumento do hematócrito foi bastante pronunciado após o desafio bacteriano, indicando recuperação dos índices eritrocitários desses peixes seis dias após a inoculação da bactéria, principalmente aqueles que consumiram SQ até 15 dias, nos quais o aumento foi estatisticamente significativo.

O mesmo pode ser visto pela concentração de hemoglobina e dos índices VCM e HCM. Segundo Tavares-Dias et al. (2009), alterações hematológicas provocadas por doenças bacterianas variam de acordo com o grau de virulência da bactéria. Roy & Munshi (1989) (apud Chen et al., 1996; Francis et al., 2002) relataram que a perca (*Anabas testudineus*), expostas por 24 horas a 5 mg de SQ L⁻¹ na água, apresentaram 20% de aumento da taxa de oxigênio e aumento do número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Ao aumentar o nível de suplementação de *ginseng* (Ginsana® G115), Goda (2008) observou que o número de eritrócitos, % de hematócrito e hemoglobina também foram significativamente maiores em comparação aos valores dos peixes do tratamento controle. Apesar disso, os valores de hematócrito e hemoglobina de 'red sea bream' (*Pagrus major*) que consumiram dietas suplementadas com ervas medicinais não apresentaram diferença estatística (Ji et al., 2007). Resultados semelhantes foram observados por Farhangi & Carter (2001) que avaliaram a substituição da farinha de peixe pelo tremoço descascado (*Lupinus angustifolius*) nas dietas para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Este alimento possui saponina em sua composição e os autores verificaram que não houve efeito sobre

o hematócrito em todos os níveis testados. Jalali et al. (2009) observaram efeito semelhante quando analisaram o consumo de Ergosan® por juvenis de esturção (*Huso huso*), e nenhuma diferença estatística foi encontrada no hematócrito, na concentração de hemoglobina, número de eritrócitos, VCM, HCM e CHCM entre os tratamentos analisados.

Antes do desafio, os peixes alimentados com SQ (exceto 400 mg kg⁻¹), por 15 dias, apresentaram menor % de hematócrito, hemoglobina, VCM e HCM demonstrando ação sobre a hematopoiese. Este tipo de resposta é semelhante ao que Harikrishnan et al. (2010) descreveram para 'goldfish' (*Carassius auratus*) após inoculação com *A. hydrophila*. Estes autores suplementaram dietas com extratos herbais e verificaram menor % de hematócrito, número de eritrócitos, hemoglobina, VCM, HCM e CHCM entre duas a quatro semanas após o início dos tratamentos na maioria dos peixes que consumiram as dietas com extratos herbais. Entretanto, os peixes do presente estudo não estavam sob desafio bacteriano, portanto acredita-se que são fatos isolados neste estudo e que podem estar ligado a algum outro fator não controlado na ocasião da amostragem, o que pode estar ou não relacionado com a ação da SQ.

Os imunoestimulantes são substâncias que podem estimular a imunidade não específica aumentando o número de fagócitos (neutrófilos, monócitos e células natural killer) e/ou aumentando a atividade respiratória de leucócitos e da lisozima. Apesar da presença de monocitose após o desafio, nos peixes que consumiram a dieta contendo 100 mg kg⁻¹ de SQ, por 15 dias, não foi possível verificar diferença estatística entre o tratamento controle. Mesmo assim, este resultado demonstra que a baixa dosagem de SQ manteve os peixes em boa condição assim como no grupo controle. Os neutrófilos e os monócitos são células fagocíticas presentes no sangue do animal e que estão envolvidos na resposta inflamatória e ataque aos patógenos. Quando há uma infecção, estes são os primeiros a migrarem para o tecido (Hrubec & Smith, 2010). Essas células, que participam da imunidade não específica, são ativadas pela lisozima que é uma enzima conhecida também pela sua capacidade em opsonizar e ativar o sistema complemento e fagócitos (Jolles & Jolles, 1984; Magnadóttir, 2006). Garcia & Moraes (2009) verificaram que 24 horas após a infecção de pacus com

Aeromonas hydrophila, houve aumento do número de neutrófilos e monócitos. Segundo Secombes (1996), é comum que a resposta inflamatória aguda seja caracterizada por um quadro de neutrofilia e monocitose. Ao administrarem vitamina C e E para pacus como imunoestimulantes, Garcia et al. (2007) verificaram que os valores de neutrófilos e monócitos não se alteraram pelo consumo das dietas, mas, após o desafio, a concentração dessas células aumentou. O mesmo foi registrado por Bruno & Munro (1986), que aos 2 e 4 dias após infectarem salmão do Atlântico e truta arco-íris com *Renibacterium salmoninarum* verificaram o aumento do número de monócitos e neutrófilos. Selvaraj et al. (2005) verificaram que neutrófilos e monócitos aumentaram significativamente em carpas que receberam injeção intraperitoneal de glucano de levedura, após o desafio com *Aeromonas hydrophila*. Entretanto, Goda (2008), após avaliar o consumo de rações suplementadas com *ginseng* por tilápia do Nilo, observou que a quantidade de monócitos não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle.

No entanto, as demais células de defesa do sistema inato, linfócitos e eosinófilos, apresentaram resultados inconcludentes frente ao consumo de SQ pelos peixes. O maior número de linfócitos foi apresentado, após o desafio, pelos peixes controle que se alimentaram, por 15 dias, de 100, 200 e 300 mg kg⁻¹ de SQ. As células natural killer são linfócitos que fazem parte do sistema de defesa celular dos teleósteos e são capazes mediar a citotoxicidade celular e produzir quimocinas e citocinas inflamatórias (Sakai, 1999; Abbas & Lichtman, 2004; Raulet, 2004). Portanto um dos sinais de infecção é o aparecimento de linfócitos (células natural killer) e aumento das concentrações de macrófagos e monócitos (Abbas & Lichtman, 2004), assim como ocorreu em carpas que receberam inoculação via injeção intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila* e thioglicolato, que aumentaram a produção de linfócitos em relação ao controle (Bozzo et al., 2007).

De modo geral, os peixes dos tratamentos contendo 100, 200 e 300 mg kg⁻¹ de SQ responderam de forma similar ao grupo controle, portanto, não houve prejuízo ao sistema imune em relação a esta variável. Ainda assim, segundo Sakai (1999) e Sado et al. (2010), a utilização de imunoestimulante nas dietas

favorece a maior atividade das células de defesa. Camundongos que foram alimentados com SQ tiveram a atividade das células natural killer bastante aumentada e esta persistiu por um prolongado período (Chavali & Campbell, 1987). Entretanto, alguns autores (Yoshida et al., 1995; Sakai, 1999; Sado et al., 2010) alertam sobre o efeito dos imunoestimulantes na produção de células do sistema imune, sendo que estas dependem de fatores como tempo, dosagem, método de administração e condição fisiológica do peixe.

A função dos eosinófilos é de defender o organismo contra os parasitas e fazer fagocitose, porém é bem menos importante do que em neutrófilos (Kindt et al. 2007; Hrubec & Smith, 2010). Em relação a estas, nenhum efeito foi observado pelo consumo de SQ. Aly & Mohamed (2010) testaram *Echinacea purpurea* como imunoestimulante para tilápia e eles verificaram que houve aumento significativo da produção de eosinófilos quando suplementaram 1ppm deste vegetal na dieta. Entretanto, segundo Garcia et al. (2007), após o desafio, peixes que foram imunoestimulados, diminuem a produção de eosinófilos e linfócitos, porém, no presente estudo, na maioria dos tratamentos, apenas o número de eosinófilos caiu, enquanto o número de linfócitos apresentou maior propensão a aumentar após o desafio. Este resultado corrobora Selvaraj et al. (2005), ao administrarem glucano de levedura via intraperitoneal em carpas. Os autores verificaram a redução do número de eosinófilos após a infecção por *Aeromonas hydrophila*. No entanto, Jalali et al. (2009) alimentaram o peixe esturjão (*Huso huso*) com um produto contendo alginato extraído de algas marrons e verificaram que o número de eosinófilos foi significativamente menor do que nos animais do grupo controle. Apesar da função dos eosinófilos não ser clara, há indício de que esta célula esteja envolvida nos processos de inflamação e defesa celular mediante degranulação, semelhante aos mastócitos, em mamíferos (Ellis, 1985; Reite, 1997). Ainda assim, poucos estudos relacionam a administração de produtos naturais, conhecidos pelas suas propriedades imunoestimulantes, com o desafio bacteriano, valores e funções da série branca do sangue de peixes.

Os trombócitos assemelham-se com as plaquetas em mamíferos. Estão envolvidos com a formação de coágulo e coagulação sanguínea, reduzem a predisposição a infecções e realizam fagocitose (Hill & Rowley, 1996; Kozinska et

al., 1999; Hrubec & Smith, 2010). Normalmente são encontrados em sítios inflamatórios e, além de possuírem funções hemostáticas, também agem como célula de defesa em peixes (Bozzo et al., 2007). O consumo de SQ pelo pacu não proporcionou trombocitose após o desafio exceto pelo grupo que consumiu 400 e 100 mg kg⁻¹ de SQ por sete e 15 dias, respectivamente. Antes da inoculação, houve aumento na produção de trombócitos dos peixes que consumiram 400 mg kg⁻¹ de SQ, por 15 e 30 dias. Entretanto, nestes mesmos peixes foi observado trombopenia após o desafio. O mesmo foi observado nos peixes que receberam 100 mg kg⁻¹ de SQ, por 30 dias. Efeito contrário foi observado por Bruno & Munro (1986) que, ao infectarem truta arco-íris e salmão do Atlântico com *Renibacterium salmoninarum*, verificaram o aumento da quantidade de trombócitos (trombocitose) após a infecção. Já Sado et al. (2010) observaram diminuição no número de trombócitos (trombopenia) ao aumentarem a quantidade de imunestimulante na dieta. No entanto, a trombopenia após o desafio bacteriano pode ter sido causada pela maior migração dessas células localizadas na circulação sanguínea para os sítios de infecção (Bozzo, et al., 2007).

Segundo Press et al. (2000), a diversidade estrutural das saponinas proporciona compostos com uma vasta ação biológica e farmacêutica. São esses compostos responsáveis pela defesa contra patógenos nas plantas, interagindo com os componentes e propriedades da membrana celular alterando e modificando sua fisiologia. Estas mudanças proporcionam a modificação do sistema imune celular como a fagocitose, secreção do oxigênio reativo, e produção de proteinases citolíticas, podendo aumentar ou suprimir a resposta de alguns parâmetros da imunidade não específica. De acordo com Mulero et al. (1998), resultados contraditórios são consequência das diferentes métodos de administração, idade do peixe, status imunológico e variações interespecíficas. Portanto, mais pesquisas, com diferentes vias de administração e combinação, devem ser realizadas com o uso de saponina de quilaia para pacus proporcionando o aumento da defesa frente as doenças.

5.0. CONCLUSÃO

Apenas os peixes que consumiram 200 mg kg⁻¹ de saponina de quilaia aos sete dias apresentaram maior sobrevivência frente a infecção experimental com *Aeromonas hydrophila*.

Os efeitos estimulantes observados foram: aumento da atividade respiratória de leucócitos após sete dias de alimentação com 100 e 200 mg kg⁻¹ de saponina de quilaia e na concentração de lisozima após 15 dias nas mesmas concentrações de SQ, independente do desafio com *Aeromonas hydrophila*.

No entanto, novos protocolos de administração da saponina de quilaia devem ser realizados a fim de determinar o melhor tempo e dose sobre os efeitos desta substância na modulação do sistema imune em peixes nativos.

6.0. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System – 2^a edition. **Library of Congress Cataloging-in-Publication Data**. An Imprint of Elsevier, Philadelphia, PA, 2004.

ABREU, J. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; URBACZEK, A. C.; FONSECA, L. M. & URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69(4): 1133-1139, 2009.

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, pp. 31-39, 2010.

ANDERSON, D. P. Immunostimulants, Adjuvants, and Vaccine Carriers in Fish: Applications to Aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, pp. 281-307, 1992.

ARDÓ, L.; YIN, G.; XU, P.; VÁRADI, L.; SZIGETI, G.; JENEY, Z.; JENEY, G. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 275, pp. 26–33, 2008.

BILLER, J. D. Respostas fisiopatológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila* em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β-glucano. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

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*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73 (2), pp. 425-429, 2013.

BOZZO, F. R. Kinetics of Cellular Component in Inflammatory Response Induced by Different Stimuli in the Swim Bladder of Pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38 (2), pp. 302-308, 2007.

BRUNO, D. W. & MUNRO, A. L. S. Haematological assessment of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoninarum*. **Journal of Fish Diseases**, v. 9, pp. 195-204, 1986.

CAMUS, A. C.; DURBOROW, R. M.; HEMSTREET, W. G.; THUNE, R. L.; HAWKE, J. P. *Aeromonas* bacterial infections – Motile aeromonad septicemia. **Southern Regional Aquaculture Center**, v. 478, pp. 1-4, 1998.

CHAVALI, S. R. & CAMPBELL, J. B. Adjuvant effects of orally administered saponins on humoral and cellular immune responses in mice. **Immunobiology**, v. 174 (3), pp. 347-359, 1987.

CHAVALI, S. R.; BARTON, L. D.; CAMPBELL, J. B. Immunopotentiality by orally-administered *Quillaja saponins*: effects in mice vaccinated intraperitoneally

against rabies. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 74, pp. 339-343, 1988.

CHEEKE, P. R. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. **Journal of Animal Science**, v. 77, pp. 1-10, 2000.

CHEN, J-C.; CHEN, K-W.; CHEN, J-M. Effects of saponin on survival, growth, molting feeding of *Penaeus japonicus* juveniles. **Aquaculture**, v. 144, pp. 165- 175, 1996.

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, pp. 840-852, 2007.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v. 17, pp. 474–483, 2006.

DELVES, P. J. & ROITT, I. M. The immune system: first of two parts. *In*: IAN MACKAY , M. D. & FRED S. ROSEN, M.D. (Eds.). **Advances in Immunology**. New England journal of medicine, v. 343 (1), pp. 37-49, 2000.

DÜGENCI, K. S.; ARDA, N.; CANDAN, A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, pp. 99–106, 2003.

ELLIS, A. E. Lysozyme assays. *In*: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., Muiswinkel, W. B. (Eds). **Techniques in Fish Immunology**. USA: SOS publications, pp: 101-103. 1990.

FARHANGI, M. & CARTER, C. G. Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). **Aquaculture Research**, v. 32 (S.1), pp. 329-340, 2001.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary supplementation with a *Quillaja* saponin mixture improves growth performance and metabolic efficiency in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 203, pp. 311-320, 2002.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Effects of *Quillaja* saponins on growth, metabolism, egg production and muscle cholesterol in individually reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 129, pp.105-114, 2001.

GARCIA, F. & MORAES, F. R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum**, v. 31 (1), pp. 17-21, 2009.

GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, pp. 39-46, 2007.

GODA, A. M. A.-S. Effect of dietary ginseng herb (ginsana[®] g115) supplementation on growth, feed utilization, and hematological indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fingerlings. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39 (2), pp. 205-214, 2008.

GOPALAKANNAN, A. & ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**, v. 255, pp. 179–187, 2006.

GRAY, J. E. & DOOLITTLE, R. F. Characterization, primary structure, and evolution of lamprey plasma albumin. **Protein Science**, v. 1, pp. 289-302. 1992.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAG, O. & MAZZA, G. Saponins: Properties, Applications and Processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47 (3), pp. 231-258, 2007.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAMB, C.; HEO, M-S. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, pp. 354-361, 2010.

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, pp. 61–66, 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, pp. 41–50, 2003.

HILL, D. J. & ROWLEY, A. F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **British Journal of Haematology**, v. 92, pp. 200–211, 1996.

HOUSTON, A. H.; ROBERTS, W. C.; KENNINGTON, J. A. Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish, *Carassius auratus* L. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 15 (6), pp. 481-489, 1996.

HRUBEC, T. C. & SMITH, S. A. Hematology of Fishes *In*: WEISS, D. J. & WARDROP, K. J. (Eds.). **Schalm's Veterinary Hematology**, Sixth Edition first published - Blackwell Publishing Ltd. 2010.

JALALI, M. A.; AHMADIFAR, E.; SUDAGAR, M.; TAKAMI, G. A. Growth efficiency, body composition, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of Ergosan. **Aquaculture Research**, v. 40, pp. 804-809, 2009.

JI, S-C.; TAKAOKA, O.; JEONG, G-S.; LEE, S-W.; ISHIMARU, K.; SEOKA, M.; TAKII, K. Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science**, v. 73, pp. 63–69, 2007.

JIAN, J. & WU, Z. 2004. Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.16, pp. 185–191.

JOLLÈS, P. & JOLLÈS, J. What's new in lysozyme research? **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 63, pp. 165-189, 1984.

KOZINSKA, A.; ANTUCHOWICS, J.; KOSTRZEWA, P. Relationship between the Thrombocyte Activity and the Susceptibility of the Carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* Infection in Different Seasons. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 43, pp. 63-69, 1999.

LACAILLE-DUBOIS, M.A. & WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. **Phytomedicine**, v. 2 (4), pp. 363-386, 1996.

LEE, J. Y. & GAO, Y. Review of the Application of Garlic, *Allium sativum*, in Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43 (4), pp. 447-458, 2012.

LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; FROYSADAL, E. Study on lysozyme activity in some fish species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 6, pp. 1-5, 1989.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, pp. 137-151, 2006.

MAQSOOD, S.; SAMOON, M. H.; SINGH, P. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v 9, pp 111-120, 2009.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; POLIZELLO A. C.; AZZOLINI, A. E.; LUCISANO-VALIM Y. M. The influence of antibody functional affinity on the effector function involved in the clearance of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. **Immunology Investigation**, v. 28, pp. 89-101, 1999.

MATSUO, K. & MIYAZANO, I. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 59, pp. 1377–1379, 1993.

MISRA, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; XAVIER, B.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S. C. Pre- and post-challenge immuno-haematological changes in *Labeo rohita* juveniles fed gelatinised or non-gelatinised carbohydrate with n-3 PUFA. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 21, pp. 346-356, 2006.

MULERO, V.; ESTEBAN, M. A.; MUÑOZ, J.; MESEGUER, J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, pp. 49–62, 1998.

NINOMIYA, M.; HATTA, H.; FUJIKI, M.; KIM, M.; YAMAMOTO, T.; KUSUDA, R. Enhancement of chemotactic activity of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) leucocytes by oral administration of quillaja saponina. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, pp. 325–328, 1995.

PRESS, J. B.; REYNOLDS, R. C.; MAY, R. D.; MARCIANI, D. J. Structure/Function relationships of immunostimulating saponins. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 24, pp.131-143, 2000.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematologia como ferramenta para avaliação da saúde de peixes. In: 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes. *Anais...* 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes. Botucatu, São Paulo. Universidade Estadual Paulista, 74p. 2007.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SALLES, F. A.; EIRAS, J. C.; EIRAS, A. C.; ISHIKAWA, C. M.; ALEXANDRINO, A. C. Análises hematológicas de curimatã (*prochilodus scrofa*), pacu (*piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 25, pp. 77-83, 1999.

RAO, A. V. & SUNG, M. K. Saponins as anticarcinogens. **The Journal of Nutrition**. American Institute of Nutrition, 1995.

RAO, Y. V.; DAS, B. K.; JYOTYRMAYEE, P.; CHAKRABARTI, R. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, pp. 263-273, 2006.

RAO, Y. V.; ROMESH, M.; SINGH, A. ; CHAKRABARTI, R. Potentiation of antibody production in Indian major carp *Labeo rohita*, rohu, by *Achyranthes aspera* as a herbal feed ingredient. **Aquaculture**, v. 238, pp. 67–73, 2004.

RAULET, D. H. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. **Nature Immunology**, v. 5 (10), pp. 996-1002, 2004.

REHULKA, J. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. **Acta Veterinaria Brno**, v. 71, pp. 351–360, 2002.

REITE, O. B. Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. **Fish & Shellfish Immunology**, v.7, pp. 567–584, 1997.

RIEGER, A. M. & BARREDA, D. R. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, 1238–1245, 2010.

SADO, R. Y.; BICUDO, A. J. A.; CYRINO, J. E. P. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41 (S1), pp. 66-75, 2010.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, pp. 63–92, 1999.

SAURABH, S. & SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, pp. 223-239, 2008.

SECOMBES, C. J. The nonspecific immune system: cellular defenses. *In*: IWAMA, G. & NAKANISHI, T. (Eds.). **The fish immune system**. London: Academic Press, pp. 95-103, 1996.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish Shellfish Immunology**, v.19, pp. 293-306, 2005.

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**, v. 41, pp. 125-139, 1994.

SMOLELIS, A. N. & HARTSELL, S. E. The Determination of Lysozyme. **Journal of Bacteriology**, v. 58 (6), pp. 731-736, 1949.

TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M. M.; MARTINS, M. L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PADUA, S. B.; JERONIMO, G. T.; SANT'ANA, A. R. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo *In*: SARAN NET, A.; MARIANO, W. dos S.; SÓRIA, S. F. P. (Org.). **Tópicos especiais em saúde e criação animal**. São Carlos, SP: PEDRO & JOÃO (Eds.) pp. 43-80, 2009.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, pp. 1366–1375, 2011.

WEDEMEYER, G. A. Physiology of fish in intensive culture systems. Chapman & Hall, New York, 1996.

WENDELAAR BONGA, S. E. The Stress Response in Fish. **Physiological Reviews**, v. 77 (3), pp. 591-625, 1997.

WHYTE, S. K. The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, pp. 1127-1151, 2007.

YIN, G.; JENEY, G.; RACZ, T.; XU, P.; JUN, X.; JENEY, Z. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 253, pp. 39-47, 2006.

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. **Journal of Fish Diseases**, v. 18, pp. 195-198, 1995.

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 (10), pp. 2299-2302, 2012.