

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

USO DA *Aloe vera* L. NO MANEJO DE MATRINXÃ (*Brycon
amazonicus*)

FÁBIO SABBADIN ZANUZZO

BIÓLOGO

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Centro de Aqüicultura da UNESP



USO DA *Aloe vera* L. NO MANEJO DE MATRINXÃ (*Brycon
amazonicus*)

Fábio Sabbadin Zanuzzo

Orientador: **Prof^ª. Dr^ª. Elisabeth Criscuolo Urbinati**

Co-orientador: **Prof. Dr. Sérgio Fonseca Zaiden**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, do Centro de Aqüicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AQUICULTURA, Área de concentração em Aqüicultura em Águas Continentais.

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2010

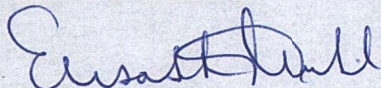
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Uso da *Aloe vera L.* no manejo de matrinxã (*Brycon amazonicus*)

AUTOR: FÁBIO SABBADIN ZANUZZO

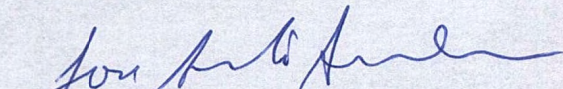
ORIENTADORA: Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

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



Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Departamento de Morfol e Fisiol Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal



Prof. Dr. JOSÉ AUGUSTO SENHORINI
CEPTA / IBAMA - Pirassununga



Prof. Dr. PAULO SERGIO CECARELLI

Departamento de Ictiopatologia / Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
Renovaveis

Data da realização: 18 de janeiro de 2010.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Beth por todos os ensinamentos seja na ciência ou na vida. Muito obrigado pelo carinho, dedicação e confiança, espero um dia poder retribuir tudo o que você tem feito, pois você merece tudo que uma pessoa possa ter.

Ao meu co-orientador Sérgio Fonseca Zaiden, pelas palavras de incentivo e “calma” durante todo o trabalho.

A Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim e Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto – USP, pela colaboração nas análises imunológicas, pela disposição de materiais e equipamentos laboratoriais.

Aos Professores Sérgio Batlouni, Paulo Carneiro, José Senhorini e Paulo Ceccarelli, pela contribuição como banca de qualificação e defesa deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de Peixes: Mariana, Aline, Ana Paula, Rullian, Carla, Mônica, Rafael, Rodrigo e Marcos, pelo auxílio durante todo esse tempo de convivência.

Aos antigos amigos de Laboratório, Fabiano, Ana Paula, Michele, Janessa e Luciana pelos valiosos ensinamentos.

A nossa técnica Damares pelas risadas, telefonemas e bom humor.

Aos meus amigos Márcio (Japão) e Gustavo (Sumo), muito obrigado pelo companherismo, sem vocês meu trabalho não seria possível.

Ao casal Takahashi (Leonardo e Jaqueline) por todas as ajudas tanto acadêmicas como pessoais.

A toda minha Família, tios e tias, primos e primas, Família Bissi, Rafael (Fi), Jeca, Vinicius, Godoy, Gugu e Betinha, pelas horas de prazer e descontração, seja em tempos bons ou ruins.

A República Biozona (Bauru, Bruno, Caio, Pastor e Rhosa) e agregados (Bizarro, Tanga, Japa, Fred, Fogo, Da Lua, Jana, Maria e Veralice), vocês foram e sempre serão minha família aqui. É disso que eu to falando!!!!

Aos meninos da Nazarena, Sabrina, Tcháina e Toca da Onça, que mesmo sem saber me ajudaram muito na execução do trabalho.

A Liliana pela compreensão mesmo nos momentos mais complicados.

A Turma da Biologia 04, pois vocês me proporcionaram os melhores anos da minha vida, com muito aprendizado e carinho, devo muito a todos vocês.

A Teresinha, pelos seis anos de convivência. A República Biozona é privilegiada de ter você como nossa empregada, nem sei se esse termo é correto já que você as vezes é nossa amiga, as vezes nossa mãe.

A minha turma de inglês, Dr. Jonas, Dra. Magarete, Cris, Dra. Silvana, Dr. Maria Amélia e teacher Adriana, you make part of it.

A todos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Caunesp e funcionários da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

O meu muito obrigado!

Ofereço e Dedico

Dedico esse trabalho a minha Família, Pai, Mãe e Irmão, vocês representam minha alegria e dedicação, agradeço todos os dias por ter uma família como essa.

“A beleza dos filhos são seus pais”

Prov. 17:6.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

USO DA *Aloe vera* L. E ESTRESSE EM PEIXES

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
O estresse e seus efeitos nos peixes.....	1
O sistema imunológico em peixes.....	4
Uso da <i>Aloe vera</i> L. na aquicultura.....	6
Matrinxã.....	8
REFERÊNCIAS.....	9

CAPÍTULO 2

USO DA *Aloe vera* L. ADICIONADO À ÁGUA DE TRANSPORTE: RESPOSTAS METABÓLICAS, HEMATOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS DO MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*)

ABSTRACT.....	17
RESUMO.....	18
INTRODUÇÃO.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Solução da <i>Aloe vera</i>	21
Protocolo experimental.....	22
Coletas e análises laboratoriais.....	22
Osmolaridade e pH das soluções de <i>Aloe vera</i>	24
Indicadores hematológicos.....	24
Ensaio da atividade respiratória de leucócitos.....	24
Ensaio da atividade respiratória de leucócitos com <i>A. vera in vitro</i> ...	25
Análise Estatística.....	26
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

CAPÍTULO 3

USO DA *Aloe vera* L. NA RECUPERAÇÃO DE INJÚRIAS CAUSADAS PELO MANEJO DE INDUÇÃO HORMONAL EM REPRODUTORES DE MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*)

ABSTRACT.....	45
RESUMO.....	46
INTRODUÇÃO.....	47
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
Local, animais e indução hormonal.....	51
Solução da <i>Aloe vera</i>	52
Delineamento Experimental.....	52
Coletas e análises laboratoriais.....	53
Osmolaridade e pH das soluções de <i>Aloe vera</i>	54
Parâmetros hematológicos.....	54
Parâmetro metabólico.....	55
Parâmetros do sistema imunológico não específico.....	55
Análise da atividade respiratória de leucócitos.....	55
Análise da atividade respiratória de leucócitos com <i>Aloe vera in vitro</i>	56
Análise da concentração e atividade de lisozima sérica.....	57
Parâmetros histológicos.....	58
Microscopia de luz.....	58
Histoquímica.....	59
Morfometria de hepatócitos.....	59
Contagem das células de muco.....	59
Análise estatística.....	59
RESULTADOS.....	59
DISCUSSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	76

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

IMPLICAÇÕES.....	86
------------------	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - USO DA *Aloe vera* L. E ESTRESSE EM PEIXES

- Figura 1. Repostas fisiológicas ao estresse em peixes de água doce (adaptado de Mazeaud e Mazeaud, 1981)..... 3

CAPÍTULO 2 - USO DA *Aloe vera* L. ADICIONADO À ÁGUA DE TRANSPORTE EM RESPOSTAS METABÓLICAS, HEMATOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS DO MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*).

- Figura 2. Concentração de NH₃ antes (basal), durante e após o transporte nos tratamentos de *Aloe vera*..... 27
- Figura 3. Osmolaridade (●) e potencial hidrogeniônico (■) das concentrações de *Aloe vera*..... 28
- Figura 4. Glicemia de matrinxã antes, durante e após o transporte 29
- Figura 5. Hematócrito, número de eritrócito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de matrinxã antes, durante e após o transporte..... 30
- Figura 6. Concentração de hemoglobina de matrinxã durante e após o transporte nos tratamentos com *Aloe vera*..... 31
- Figura 7. Atividade respiratória de leucócitos de matrinxã antes, durante e após o transporte nos tratamentos com *Aloe vera*..... 32
- Figura 8. Atividade respiratória de leucócitos com tratamentos de 0,01%, 0,02%, 0,05% e 0,1% de *Aloe vera in vitro*, controle (PBS)..... 33

CAPÍTULO 3 - USO DA *Aloe vera* L. NA RECUPERAÇÃO DE INJÚRIAS CAUSADAS PELO MANEJO DE INDUÇÃO HORMONAL EM REPRODUTORES DE MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*).

- Figura 9. Produção de hormônios e sua atuação nas diferentes estruturas reprodutivas de peixes migradores brasileiros (adaptado de Cyrino et al., 2004)..... 48
- Figura 10. Curva padrão de lisozima..... 58

Figura 11. Concentração de NH_3 na água nos tratamento com <i>Aloe vera</i> após a reprodução.....	60
Figura 12. Osmolaridade (●) e potencial hidrogeniônico (■) das concentrações de <i>Aloe vera</i>	61
Figura 13. Glicemia de matrinxã antes (Test), após reprodução (AP) e tratamentos com <i>Aloe vera</i> (C, T1 e T2).....	62
Figura 14. Hematócrito, número de eritrócito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de matrinxã antes (Test), após reprodução (AP) e tratamentos com <i>Aloe vera</i> (C, T1 e T2).....	63
Figura 15. Atividade respiratória de leucócitos de matrinxã antes (Test), após reprodução (AP) e tratamentos com <i>Aloe vera</i> (C, T1 e T2).....	64
Figura 16. Atividade respiratória de leucócitos com tratamentos de 0,01%, 0,02%, 0,05% e 0,1% de <i>Aloe vera in vitro</i> , controle (PBS).....	65
Figura 17. Concentração de lisozima em soro de matrinxã antes (Test), após reprodução (AP) e tratamentos com <i>Aloe vera</i> (C, T1 e T2).....	65
Figura 18. Fotomicrografia de cortes transversais de fígado de matrinxãs antes, após reprodução e tratamentos com <i>Aloe vera</i>	66
Figura 19. Área do citoplasma (■) e do núcleo (≡) de hepatócitos de matrinxã antes (Test), após reprodução (AP) e tratamentos com <i>Aloe vera</i> (C, T1 e T2).....	67
Figura 20. Fotomicrografia de cortes transversais de fígado de matrinxãs após reprodução.....	68
Figura 21. Fotomicrografia de cortes transversais de pele de matrinxãs antes, após reprodução e tratamentos com <i>Aloe vera</i>	69
Figura 22. Número de células de muco relacionado com o tempo de mortes de matrinxã após a reprodução em tratamentos com <i>Aloe vera</i>	70

CAPÍTULO 1

USO DA *Aloe vera L.* E ESTRESSE EM PEIXES

INTRODUÇÃO GERAL

O estresse e seus efeitos nos peixes

O crescimento populacional acelerado dos últimos anos demanda desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que incrementem a produção de alimento. A piscicultura se destaca como um setor com grande potencial, ainda pouco aproveitado na produção de alimentos (OSTRENSKY et al., 2008). Entre as técnicas que podem maximizar a produção na piscicultura está o manejo controlado. Porém, durante esse processo produtivo, os peixes são submetidos a diferentes agentes estressores entre os quais, a captura, confinamento, transporte, manejo da reprodução, entre outros, os quais devem receber uma atenção especial, pois podem prejudicar a produtividade (URBINATI e CARNEIRO, 2004).

A resposta de estresse representa a reação a um estímulo adverso que pode alterar o estado de homeostase fisiológica do peixe (BARTON e IWAMA, 1991). Segundo Wendeelar-Bonga (1997), o estresse pode ser definido como uma condição em que o equilíbrio dinâmico do organismo, ou homeostase, é ameaçado ou perturbado em decorrência da ação de estímulos intrínsecos e extrínsecos denominados estressores. Graças ao processo de adaptação que ocorre durante a resposta de estresse, os peixes, ao longo da evolução, conseguiram transpor obstáculos, como fugir do predador, lutar, ou viver em condições não adequadas. Porém, se um animal está submetido a estresse intenso e constante, a resposta fisiológica pode perder seu valor adaptativo e tornar-se disfuncional, acarretando danos permanentes à sua saúde e bem-estar (WENDEELAR-BONGA, 1997; CARMICHAEL, 1984).

Durante o estresse, ocorrem alterações fisiológicas primárias, secundárias e terciárias típicas, que indicam o grau de alteração provocada pelo fator estressor. Esse

conjunto de respostas desencadeadas pela ação do agente estressor é controlado por um complexo sistema neuro-endócrino, com dois componentes principais: o sistema simpático-cromafim e o eixo hipotálamo-pituitária-interrenal. No primeiro, o sistema nervoso central estimula as células cromafins a produzirem as catecolaminas, adrenalina e noradrenalina (sistema simpático-cromafim) e no segundo o sistema nervoso central estimula o hipotálamo a produzir o hormônio liberador de corticotrofina, CRH, que induz a glândula pituitária a produzir a corticotropina, ACTH, e, por fim, esta estimula as células interrenais a produzirem o cortisol (eixo hipotálamo-pituitária-interrenal). Este hormônio é considerado um dos principais indicadores de estresse em peixes (BARTON e IWAMA, 1991). Os efeitos causados por estes dois componentes são chamados de efeitos primários do estresse (BARTON e IWAMA, 1991; SUMPTER, 1997.) A ação dos corticosteróides e das catecolaminas no organismo do animal provoca os chamados efeitos secundários do estresse que são metabólicos, hematológicos, osmorregulatórios e cardiorespiratórios.

Em condição de estresse, a glicose, fonte de energia primária do corpo, é mobilizada dos locais de armazenamento (fígado e músculos). O sangue, que transporta o oxigênio e a glicose, é desviado dos órgãos que não são essenciais para o esforço físico, como a pele e intestinos, e é enviado rapidamente para órgãos que são cruciais, tais como o coração, os músculos esqueléticos e o cérebro (BARTON e IWAMA, 1991; SAPOLSKY, 1990; WENDELAAR BONGA, 1997).

Em consequência da ação crônica do cortisol, ocorrem prejuízos na resposta imunológica, crescimento e reprodução, caracterizando os efeitos terciários do estresse (MAZEAUD et al., 1977; MOMMSEN et al., 1999; URBINATI e CARNEIRO, 2004) (Figura 1).

Uma importante alteração ocorre no sistema imunológico não específico representado pelo conjunto de respostas que compõem o mecanismo de defesa que protege o organismo contra infecções, sem depender de uma prévia exposição a nenhum tipo específico de agente etiológico. Fazem parte desse mecanismo os leucócitos, monócitos, macrófagos e neutrófilos (VERLHAC e GABAUDAN, 1997). O cortisol suprime as funções dessas células e conseqüentemente aumentam a susceptibilidade dos peixes a doenças (PICKERING et al., 1981; BURRELLS et al., 2001).

O sistema imunológico em peixes

O sistema imunológico dos peixes apresenta certa similaridade com o de outros vertebrados, porém sua resposta inata é mais importante em relação a adquirida quanto comparado aos mamíferos (SAURABH e SAHOO, 2008). Os peixes não possuem linfonodos nem medula óssea, sendo o timo, rim cefálico, baço e tecidos associados com o intestino, seus tecidos linfóides (ZAPATA et al., 1996; PASTORET et al., 1998).

A imunidade inata, natural ou não específica é a primeira linha de defesa do corpo. É definida como um conjunto de mecanismos que protege o organismo contra infecções, sem uma prévia exposição ao agente causador (BOLS et al., 2001). Parte das respostas inatas inclui os leucócitos, que após diapedese e quimiotaxia até o foco lesado, são capazes de reconhecer patógenos, fagocitá-los e degradá-los. O processo de fagocitose tem início com o englobamento do patógeno por meio de pseudópodos, internalização com formação de fagossoma, fagolisossoma com início de eventos microbicidas e degradação (ROITT et al., 1998). Quando a fagocitose é iniciada, ocorre um aumento no consumo de oxigênio molecular, conhecido como “explosão” oxidativa (do inglês *oxidative burst*). O oxigênio é reduzido, via sistema NADPH oxidase, a ânion superóxido que, por sua vez, é precursor de várias espécies reativas de oxigênio (EROs),

como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH^\cdot) e ânions oxigênio ($^1O_2^-$). As EROs são altamente oxidantes e contribuem ativamente com a destruição dos microorganismos (VERLHAC e GABAUDAN, 1997).

Além de células, existem várias moléculas envolvidas nos mecanismos de defesa inata, conhecidas como mediadores químicos solúveis. Estão presentes no soro, na forma inativa ou de precursores, e suas concentrações elevam-se rapidamente durante infecção (VERLHAC e GABAUDAN, 1997). Dentre esses mediadores, o sistema complemento representa uma cascata de reações enzimáticas que, quando ativadas, participam de respostas inespecíficas e/ou adquiridas. Em peixes, a ativação de uma das vias do sistema complemento, a via alternativa, é bem mais comum do que em mamíferos, indicando a importância desta resposta inata neste grupo de animais.

A lisozima, por sua vez, é outro importante agente do sistema imunológico, como componente não específico, encontrado em várias espécies de peixes (LIE et al., 1989). Esta enzima apresenta atividade lítica contra bactérias gram-positiva e gram-negativa, e está presente no muco, tecidos linfoides, plasma e outros fluidos do corpo, tanto em peixes marinho como de água doce. A atividade da lisozima, juntamente com outros indicadores da atividade imunológica como complemento, varia de acordo com muitos fatores como: a idade, sexo, estação, temperatura e pH da água, infecção, grau de estresse, agentes químicos e imunoestimulantes (SAURABH e SAHOO, 2008).

Um imunoestimulante pode ser uma droga, um quadro de estresse ou qualquer ação que promova ativação dos mecanismos de defesas específicos ou não específicos (SAURABH e SAHOO, 2008). Recentemente, uma larga escala de imunoestimulantes tem sido usada na aquicultura, e alguns deles têm promovido aumento da lisozima no soro (ENGSTAD et al., 1992; KUMARI e SAHOO 2006), e conseqüentemente uma maior proteção contra uma variedade de doenças em peixes.

Uso da *Aloe vera* L. na aquicultura

O mercado de produtos naturais cresceu vertiginosamente nos últimos anos, e estima-se que, nos Estados Unidos, esse mercado movimentou quatro bilhões de dólares. Nesse contexto, tem-se focado muito o uso de ervas como potencial terapêutico para a modulação de respostas imunes, especialmente o uso de plantas medicinais para prevenir e controlar doenças em peixes (GALINA et al., 2009).

O uso de imunostimulantes é uma alternativa às drogas, antibióticos e outros químicos, no controle de doenças e aumento da resposta imune (GALEOTTI, 1998; SAKAI, 1999). Estas substâncias podem ser administradas por injeção, banho ou via oral, sendo a última maneira a mais utilizada (JENEY e ANDERSON, 1993; SAKAI, 1999; YIN et al., 2006). Os mais conhecidos imunostimulantes são proteínas da membrana de bactérias, como os lipopolissacarídeos (GOETZ et al., 2004) e os glucanos. Entretanto, componentes sintéticos, vitaminas e extratos de plantas também podem aumentar a resposta não específica (ANDERSON, 1992, RAA et al., 1992; JENEY e ANDERSON, 1993; SAKAI, 1999; RAA, 2000).

As plantas medicinais também estão sendo muito usadas na aquicultura (CITARASU, 2009), como agente antimicrobiano, nutricional, e seus efeitos no sistema imune estão sendo estudados, tendo como exemplo algumas ervas chinesas, como: *Astragalus membranaceus*, *Scutellaria baicalensis*, *Ganoderma lucidum*, *Lonicera japonica*, e indianas: *Ocimum sanctum*, *Phyllanthus emblica*, *Azadirachta indica*, *Solanum trilobatum* (GALINA et al., 2009). Entre as plantas medicinais, a *Aloe vera*, vulgarmente conhecida como babosa, tem significativa presença tanto na pesquisa quanto no uso popular (HABEEB et al., 2007). Tem sido amplamente utilizada em comidas, cosméticos e na medicina (GRINDLAY e REYNOLDS, 1986). Estudos têm revelado que a *Aloe vera* possui muitas substâncias com propriedades farmacêuticas,

como: anti-inflamatória (YAGI et al., 2002), antioxidante (YAGI et al., 2003), rejuvenescedora (LIM et al., 2003), anticancerígena (SU et al., 2005; DESAI et al., 1996), imunostimulante (IM et al., 2005; KARACA et al., 1995; SJERABA e QUERE, 2000; LEE et al., 2001), além de atividade fungicida (SAKS e BARKAI-GOLAN, 1995), especificamente contra *Botrytis gladiolorum*, *Fusarium oxysporum*, *Heterosporium pruneti* e *Penicillium gladioli* (CASIAN et al., 2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Atividades farmacológicas dos componentes da *Aloe vera* (adaptado de CHOI e CHUNG, 2003).

Componentes	Atividades Farmacológicas
glicoproteínas	cicatrizante, proliferação celular e anti-alérgica
aloe-emodina	purificadora, proliferação celular, anticancerígena,
(antraquinona)	antiprotozoária, antibacteriana, e antioxidante
manose-6-fosfato	cicatrizante e anti-inflamatória
polissacarídeos	imuno-moduladora e anticancerígena
acemanano	imuno-moduladora, anticancerígena, e efeito antimicrobiano
aloesina	proliferação celular, inibidora da síntese de melanina
B-sitosterol	anti-inflamatória e angiogênese
outras substâncias	anticancerígena e imuno-moduladora

A *Aloe vera* é nativa do sudeste da Índia, mas foram os chineses os primeiros a usarem suas propriedades medicinais (WALLER et al., 1978). Essa planta pertence à família Liliaceae, com mais de 360 espécies, embora somente três delas tenham propriedades medicinais. Mais de 75 ingredientes ativos foram encontrados na *Aloe vera*, entre eles enzimas, vitaminas, lignina, açúcares, aminoácidos e ácido salicílico (HABEEB et al., 2007). Também contém acemanano e acetilato de glucomanano, que

são imuno-estimulantes, e estão sendo usados inclusive no combate ao vírus da AIDS. O acemanano tem suposta habilidade de ativar macrófagos e estimular o sistema complemento (CHOW et al., 2005). Embora a *A. vera* tenha muitos efeitos já comprovados, pouco se tem pesquisado sobre seu efeito na piscicultura (KIM et al., 1999) e pesquisas são necessárias tendo em vista as inúmeras possibilidades de uso, por ser um produto de origem vegetal, não causar danos ao meio ambiente quando comparados a outros produtos, além de ser um produto de fácil acesso e possuir muitas propriedades de interesse para a produção animal.

Matrinxã

Pesquisas visando maior conhecimento sobre espécies nativas são muito importantes no cenário da aquicultura brasileira, pois há várias espécies excelentes para produção, porém há um déficit de conhecimento para sucesso da cadeia produtiva (BALDISSEROTTO e GOMES, 2005).

Em recente revisão, Lima (2003) verificou que a espécie *Brycon cephalus* que ocorre na Amazônia brasileira, e que tem sido criada em várias regiões do Brasil, é na verdade a espécie *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829), genericamente conhecida como matrinxã. A distribuição de *B. cephalus* restringe-se ao alto rio Amazonas no Peru e na Bolívia (Lima, 2003).

O *B. amazonicus* apresenta importância econômica para a piscicultura onde tem sido criado, principalmente na região Norte, onde é o terceiro peixe mais consumido e sua produção na aquicultura nacional em 2006 foi de 701 toneladas (HOWES, 1982; GRAEF et al., 1987; GOMES e URBINATI, 2005; OSTRENSKY et al., 2008). A criação do matrinxã é motivada por características favoráveis como ótima

taxa de conversão alimentar, crescimento rápido, hábito alimentar onívoro, carne nobre (WERDER e SAINT PAUL, 1978), e ainda por seu valor na pesca esportiva.

Entretanto, a espécie, assim como outros peixes, tem problemas no manejo, de caráter estressante, que levam a perdas econômicas. O matrinxã tem sido estudado quanto à sua resposta a diversos agentes estressores comuns na criação de peixes, como transporte, densidade de estocagem, alimentação e reprodução (CARNEIRO e URBINATI, 2001; GOMES e URBINATI, 2005). Entretanto, não há informações disponíveis sobre as respostas imunológicas da espécie, frente ao estresse causado pelos diversos agentes relacionados ao manejo.

Diante do exposto acima, a presente pesquisa se propõe a testar um produto de origem natural, de comercialização fácil e a baixo custo, com propriedades já destacadas, em práticas de manejo comuns a todos produtores, visando diminuir os prejuízos causando pelo estresse na produção de matrinxã. O estudo enfoca duas práticas de manejo: o transporte de peixes juvenis e o processo de indução hormonal de desova em reprodutores.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. In: Faisal, M.; Hetrick, F.M. (editores) Annual Review of Fish Diseases. Pergamon Press, New York, p. 281–307, 1992.
- BALDISSEROTTO, B; GOMES, L.C. (Org.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Editora UFSM, Santa Maria. 470p, 2005.

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

BOLS, N.C.; BRUBACHER, J.L.; GANASSIN, R.C; LEE, L.E.J. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, v.25. p. 853-873, 2001.

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

CARMICHAEL, G.J. Long distance truck transport of intensively reared largemouth bass. *The Progressive Fish-Culturist*, v.46, p.11-115, 1984.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research*. v.32, p.297-304, 2001.

CASIAN, R.O.; PARVU, M.; VLASE, L.; TAMAS, M. Antifungal activity of *Aloe vera* leaves. *Fitoterapia*, v.78, p.219–222, 2007.

CITARASU, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 2009. DOI 10.1007/s10499-009-9253-7

CHOI, S.; CHUNG, M.H. A review on the relation between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*, v.1, n.1, p. 53-62, 2003.

CHOW, J.T.; WILLIAMSON, D.A.; YATES K.M.; GOUX, W.J. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. *Carbohydrate Research*, v. 340, p.1131–1142, 2005.

DESAI, K.N.; WEI, H.; LAMARTINIERE, C.A. The preventive and therapeutic potential of the squalene-containing compound, Roindex, on tumor promotion and regression. *Cancer Letters*. v.101, p.93, 1996.

ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish and Shellfish Immunology*, v.2, p. 287-297, 1992.

GALEOTTI, M. Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. *Journal of Applied Ichthyology*. v.14, p. 189–199, 1998.

GALINA, J.; YIN, G.; ARDÓ, L.; JENEY, Z. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2009. DOI 10.1007/s10695-009-9304-z

GOETZ, F.W.; ILIEV, D.B.; MCCAULEY, L.A.R.; LIARTE, C.Q.; TORT, L.B.; PLANAS, J.V.; MACKENZIE, S. Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. *Molecular Immunology*, v. 41, p. 1199–1210, 2004.

GOMES, L.C.; URBINATI, E.C. Criação de matrinxã. In: BALDISSEROTTO, B; GOMES, L.C. (Org.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria v. 1, p.149-174, 2005.

GRAEF, E.W.; RESENDE, E.K., PETRY, P.; STORTI-FILHO, A. Policultivo de matrinxã (*Brycon* sp) e jaraqui (*Semaprochilodus* sp) em pequenas represas. *Acta Amazonica*, v.17, p.33-42, 1987.

GRINDLAY, D.; REYNOLDS, T. The *Aloe vera* phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Journal of Ethnopharmacology*, v.16, p.117-151, 1986.

HABEEB, F.; SHAKIR, E.; BRADBURY, F.; CAMERON, P.; TARAVATI, M.R.; DRUMMOND, A.J.; GRAY, A.I. FERRO, V.A. Screening methods used to determine the anti-microbial properties of *Aloe vera* inner gel. *Methods*, v.42, p.315–320, 2007.

HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). *Bulletin of the British Museum of Natural History and Zoology*, v.43, p.1-47, 1982.

IM, S.A.; OH, S.T.; SONG, S.; KIM, M.R.; KIM, D.S.; WOO, S.S.; JO, T.H.; PARK, Y.I.; LEE, C.K. Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *International Immunopharmacology*. v. 5, p. 271-279. 2005.

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 3, p. 51–58, 1993.

KARACA, K.; SHARMA, J.M.; NORDGREN, R. Nitric oxide production by chicken macrophages activated by acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. *Journal Immunopharmacology*, v.17, p.183, 1995.

KIM, K.H.; HWANG, Y.J.; BAI, S.C. Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish *Sebastes schlegelii* fed diets containing different doses of aloe. *Aquaculture*, v.180, p. 13-21, 1999.

KUMARI, J.; SAHOO, P.K. Dietary β -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, v. 29, p. 95-101, 2006.

LEE, J.K.; LEE, M.K.; YUN, Y.P.; KIM, Y.; KIM, J.S.; KIM, Y.S.; KIM, K.; HUAN, S.S.; LEE, C.K. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *International Immunopharmacology*, v. 1, p. 1275-1284, 2001.

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

LIM, B.O.; SEONG, N.S.; CHOUE, R.W.; KIM, J.D.; KIM, J.D.; LEE, H.Y.; KIM, S. Y.; YU, B.P.; JEON, T.I.; PARK, D.K. A quantitative study on arginine synthesis from argininosuccinic acid and citrulline by crude enzymes of cattle kidney. *Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology*, v.49, p.292, 2003.

MAZEAUD, M.M., MAZEAUD F., DONALDSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data a general review. *Transactions of American Fisheries Society*, v.106, p.201-212, 1977.

MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F. Adrenergic responses to stress in fish. In: Pickering A. D. (Ed), *Stress and fish*. Academic Press, p. 49-76, 1981.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 9, p. 211-268, 1999.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. *Aqüicultura no Brasil: O desafio é crescer*. Brasília, 276p, 2008.

PASTORET, P.P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. Immunology os fishes. In: *Handbook of vertebrate immunology*, San Diego: Academic Press. p. 3-62, 1998.

PICKERING, A.D. Introduction: the Concept Biological Stress. *In: Stress and fish*. Pickering A.D. (editor). Academic Press, p.367, 1981.

RAA, J.; ROERSTADT, G.; ENGSTADT, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, M.; SUBASINGHE, R.P.; ARTHUR, J.R. (editores) *Diseases in Asian aquaculture. I. Proc. 1st Symposium Disease Asian Aquaculture*. Manila, Philippines, p 39-50, 1992.

- RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: CRUZ-SUAREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; CIVERA-CERECEDO, R. (editor) *Advance en Nutricion Acuicola v. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrcion Acouicola*. Merida, Yucatan, p. 47–56, 2000.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Immunology*. 5° ed. London, Mosby. 423p. 1998.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulant. *Aquaculture*, v.172, p. 63–92, 1999.
- SAKS, Y.; BARKAI-GOLAN, R. *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. *Postharvest Biology and Technology*, v.6, p.159–165, 1995.
- SAPOLSKY, R.M. Stress in the Wild. *Scientific American*, p.106-113, January 1990.
- SAURABH, S.; SAHOO, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, v. 39. p. 223-239, 2008.
- SJERABA, A.; QUERE, P. In vivo macrophage activation in chickens with acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. *Journal Immunopharmacology*, v.22, p.365, 2000.
- SU, Y.T.; CHANG, H.L.; SHYUE, S.K.; HSU, S.L. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. *Biochemical Pharmacology*, v.70, p.229, 2005.
- SUMPTER, J.P. The endocrinology of stress. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (editors). *Fish stress and health in aquaculture*, 277p, 1997.
- URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.;

CASTAGNOLLI, N. (editores). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Ed: TecArt, 533p, 2004.

WALLER, G.R.; MANGIAFICO, S.; RITCHEY C.R. A chemical investigation of *Aloe Barbadosis* Miller. Proceedings of the Oklahoma Academy of Science v.58, p.69-76, 1978.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. Physiological Reviews, v. 77, p.591-625, 1997.

WERDER, U.; SAINT PAUL, U. Feeding trials with herbivorous and omnivorous Amazonian fishes. Aquaculture, v.15, p.175-177, 1978.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. The effect of vitamin C on fish health. Brochure nº 51002. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland, 1997.

WON, K.M.; KIM S.M.; PARK, S.I. The effects of β -1, 3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. Journal of Fish Pathology, v.17, p.29-38, 2004.

YAGI, A.; KABASH, A.; OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; MOUSTAFA, S.M.; KHALIFA, T.I. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. Planta Medicinal, v.68, p.957-960, 2002.

YAGI, A.; KABASH, A.; MIZUNO, K.; MOUSTAFA, S.M.; KHALIFA, T.I.; TSUJI, H. Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 synthase from *Aloe vera* gel. Planta Medicinal, v.69, p.269-271, 2003.

YIN, G.; JENEY G.; RÁCZ, T.; PAO, 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, p.39-47, 2006.

ZAPATA, A.; CHIBÀ, A.; VARAS, A. Cell tissues of the immune system of fish. In IWAMA, G.K.; NAKANISHI, T. (editores). The fish immune system: organism, pathogen and environment. San Diego: Academic Press, p. 1-62, 1996.

CAPÍTULO 2

A Aloe vera L. NA ÁGUA DE TRANSPORTE: RESPOSTAS METABÓLICAS,
HEMATOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS DO MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*)

ABSTRACT

Aloe vera has many substances with pharmaceutical properties such as wound healer, immunostimulant, fungicide and others. The use of its extract can be effective in the treatment of problems caused by the handling of fish, such as in the transport, when injuries occur, and the stress can reduce immune responses of fish. This study evaluated the effects of *Aloe vera* added to the water in the transport of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*) in hematological, metabolic and immune indicators. After 48 hours of fasting, fish were transported in different concentrations of *Aloe vera* (0%, 0.002%, 0.02% and 0.2%) and sampled before transport (initial - n = 8) at 2 hours of transport (n = 10), and 4 hours (arrival - n = 8), 24 and 96 hours after the procedure (recovery - n = 8). At arrival, fish were distributed, according to the treatment, in four tanks of 1.000 l, with a continuous water flow. Fish blood was drawn and hematocrit, number and volume of erythrocytes, hemoglobin, respiratory activity of leukocytes, and glucose concentration were determined. The results did not show any consistent pattern in hematological indicators. Plasma glucose concentration increased after 2 and 4 hours of transport in fish of all treatments, without difference among them, and returned to basal amount in 24 and 96 hours after transport. The respiratory activity of macrophages increased within 2 hours of transport in fish exposed to *Aloe vera*. *Aloe vera* also increased the respiratory activity of macrophages *in vitro*, reinforcing its stimulant effect. The results indicate that the addition of *Aloe vera* in water transport did not affect the metabolic and hematological indicators, but enhanced the nonspecific immune response tested.

Keywords: *Aloe vera*, matrinxã, immune response, transport.

RESUMO

Estudos têm revelado que a planta *Aloe vera* possui muitas substâncias com propriedades farmacêuticas tais como ação cicatrizante, imuno-estimulante, fungicida entre outras. O uso de seu extrato pode ser eficiente no tratamento de problemas advindos do manejo na piscicultura, como no transporte, onde ocorrem injúrias e quadro de estresse com imunossupressão. O presente trabalho avaliou os efeitos da *Aloe vera* adicionada na água no transporte de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*) em indicadores hematológicos, metabólico e imunológico. Após 48 horas de jejum, peixes foram transportados em diferentes concentrações de *Aloe vera* (0%; 0,002%; 0,02% e 0,2%) e amostrados antes do transporte (nível inicial – n=8), às 2 horas de transporte (n=10), após 4 horas (na chegada – n=8), 24 e 96 horas depois do transporte (período de recuperação – n=8). Após o transporte, os peixes foram distribuídos, conforme o tratamento, em quatro caixas de 1.000 litros, com fluxo contínuo de água. No sangue total foram determinados o hematócrito, número e volume de eritrócitos, concentração de hemoglobina e atividade respiratória de leucócitos, e no plasma a concentração de glicose. Os resultados hematológicos não apresentaram padrão consistente. A glicemia aumentou após duas e quatro horas de transporte nos peixes de todos os tratamentos, sem diferença entre eles, e voltou aos valores iniciais (pré-transporte) 24 e 96 horas pós transporte. Na atividade respiratória dos macrófagos houve um aumento em duas horas de transporte nos peixes expostos à *Aloe vera*. A *Aloe vera* também aumentou a atividade respiratória dos macrófagos *in vitro*, provando assim sua ação imunoestimulante. Os resultados indicam que a adição de *Aloe vera* na água de transporte não afetou as respostas metabólica e hematológicas, mas potencializou a resposta imunológica não específica.

Palavras-chaves: *Aloe vera*, matrinxã, resposta imunológica, transporte.

INTRODUÇÃO

O matrinxã (*Brycon amazonicus*) é um peixe nativo da América do Sul, que apresenta importância econômica para a piscicultura em várias regiões do Brasil (HOWES, 1982; GRAEF et al., 1987; GOMES e URBINATI, 2005; OSTRENSKY et al., 2008), sendo principalmente encontrado em pesqueiros. Por sua natureza agressiva é muito apreciado pelos pescadores esportivos, além do seu alto valor comercial devido sua carne de excelente qualidade. Indivíduos jovens da espécie apresentam forte comportamento territorialista e agressividade entre indivíduos (SERRA et al., 2008; FERRAZ E GOMES, 2009), e este comportamento dificulta práticas de manejo como é o caso do transporte em que ocorre agrupamento dos peixes. Perdas por mortalidade costumam ser comuns após o transporte em decorrência direta ou indireta do estresse (KUBITZA, 1997).

O transporte é considerado um processo traumático que expõe o peixe a uma série de estímulos adversos, responsáveis por várias respostas fisiológicas (URBINATI et al., 2004). Os estímulos relacionados ao transporte incluem a captura nos tanques, exposição aérea, biometria, manejo para embalar os animais, concentração alterada de amônia na água, alta densidade de estocagem, contato entre os peixes e com a estrutura de transporte, o movimento irregular e soltura pós transporte (SPECKER e SCHRECK, 1980; BARTON e PETER, 1982; JOHNSON e METCALF, 1982; CARMICHAEL et al., 1983; ROBERTSON et al., 1987; McDONALD et al., 1993; STAURNES et al., 1994; IVERSEN et al., 1998; URBINATI et al., 2004), tornando necessário algumas medidas mitigadoras.

Já na captura, ocorre gasto excessivo de energia, seguida de exposição aérea para contagem e transferência para o meio de transporte e nesses procedimentos, há um

aumento da demanda fisiológica devido ao estresse do manejo (CARMICHAEL et al., 1983; URBINATI et al., 2004; HOSHIBA et al., 2009).

Para reduzir o estresse no transporte, Tucker (1985) e Grottum et al. (1997) observaram que o jejum dos peixes reduziu o consumo de oxigênio, a excreção de amônia e gás carbônico. O objetivo deste procedimento é melhorar a qualidade de água, permitindo o aumento da densidade dos peixes e o tempo de transporte.

A adição de substâncias na água de transporte é muito discutida, incluindo o sal de cozinha (NaCl) (CARNEIRO e URBINATI, 2001; GOMES et al., 2003), soluções tamponantes (AMEND et al., 1982), sais de cálcio (MAZIK et al., 1991; BENDHACK e URBINATI, 2009) e principalmente anestésicos (URBINATI e CARNEIRO, 2001; SANDODDEN e IVERSEN, 2001; PAVLIDIS et al., 2003; ROSS e ROSS, 2008). O uso de anestésicos no transporte de peixes é muito discutido, pois existem resultados contraditórios sobre os efeitos de diferentes anestésicos diluídos na água de transporte, em diferentes espécies de peixes (WURTS, 1995; CARNEIRO e URBINATI, 2001; URBINATI e CARNEIRO 2001).

Várias substâncias tem sido testadas no transporte, porém a adição de imunoestimulantes na água de transporte surge como uma possibilidade recente para reduzir o estresse e melhorar a condição fisiológica dos peixes. Muitos imunoestimulantes estão sendo usados na aquicultura, como substâncias químicas sintéticas (levamisole, FK-565 – isolado de culturas de *Streptomyces olivaceogriseus*), substâncias biológicas (derivados de bactérias, polissacarídeos, extrato animal e vegetal) como *Saccharomyces cerevisiae* (HE et al., 2009), fatores nutricionais (vitaminas C e E), hormônios (prolactina e hormônio do crescimento) e citocinas (polipeptídios e glicoproteínas) (RAA, 1996, SAKAI, 1999).

Estudos em mamíferos indicam que a *Aloe vera*, possui importantes propriedades terapêuticas como anti-inflamatória (YAGI et al., 2002), imuno-estimulante (IM et al., 2005; SJERABA e QUERE, 2000), além de atividade cicatrizante (DAVIS et al., 2001; CHOI et al., 2001), porém pouco se sabe sobre seu uso na piscicultura, embora o uso do extrato para reparar danos em tecidos de peixes tenha sido patenteado em 1985 (PATENT STORM, 1985). Kim et al. (1999) usando suplementação de *A. vera* na ração mostraram seu efeito positivo no controle da infestação de *Sebastes schlegeli* com *Vibrio alginolyticus*.

Nesse contexto, o uso da *Aloe vera* pode ser uma alternativa a antibióticos e outros produtos, por ser natural e ainda possuir propriedades anti-inflamatória (YAGI et al., 2002), anti-oxidante (YAGI et al., 2003), imuno-estimulante (IM et al., 2005; SJERABA e QUERE, 2000), além de atividade fungicida (SAKS e BARKAI-GOLAN, 1995), podendo ser muito útil no transporte de peixes. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da *Aloe vera* adicionado na água no transporte de matrinxã em indicadores hematológicos, metabólico e imunológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Solução da *Aloe vera*

Os tratamentos foram definidos após a realização de um experimento piloto que estabeleceu as concentrações 0,002%, 0,02% e 0,2%. A *Aloe vera* PÓ 200:1 SPRAY DRIED (Jungconsult do Brasil Produtos Naturais Ltda) foi obtida a partir do gel claro e cristalino de folhas frescas de *Aloe vera* obtido por um processo de extração, purificação e concentração. Este concentrado é seco pelo sistema “spray dried”. Cada parte de pó é produzido a partir de 200 partes de gel interno de *Aloe vera*.

Protocolo experimental

O estudo foi desenvolvido no Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP), Jaboticabal-SP. Os peixes (n=144; $84,7 \pm 16,3$ g) foram estocados em 4 caixas de 1.000L com renovação de água e aeração, permanecendo em jejum durante 48 horas. Após este período, foram embalados 12 peixes em cada saco plástico com capacidade para 20L (5L de água e 15L de oxigênio), com densidade de 200 g L^{-1} e colocados dentro de caixas de papelão para evitar perfurações, aumento da temperatura e luminosidade. Utilizou-se 6 sacos para cada tratamento (réplicas). Os tratamentos foram três concentrações de *Aloe vera* e um controle (0% - controle; 0,002% - tratamento1; 0,02% - tratamento 2 e 0,2% - tratamento 3) dissolvido na água de transporte. Os peixes foram amostrados (n=8) antes do transporte (nível inicial), após duas horas de transporte (n=10), após quatro horas (n=8, na chegada), 24 e 96 horas depois (n=8, recuperação). Na amostragem de duas horas de transporte, foram utilizadas duas repetições de cada tratamento (cinco peixes de cada), e a seguir essas repetições foram eliminadas para evitar manuseio repetido.

O transporte foi realizado em uma caminhonete na qual foi instalada uma lona sobre a carroceria para evitar a exposição dos peixes ao sol durante as 4 horas de viagem. Na chegada, os peixes foram amostrados e o restante devolvido para as caixas de 1000L em que estavam antes do transporte (uma caixa por tratamento) para avaliação da recuperação.

Coletas e análises laboratoriais

Foram coletadas amostras de água antes do experimento (basal) e no momento das amostragens dos peixes para determinar o pH (peagâmetro YSI 63), temperatura e concentração de oxigênio dissolvido (oxímetro digital YSI 55) e amônia total (Reagente

de Nessler). Para cálculo da amônia não-ionizada (NH_3) foi utilizada a fórmula descrita por Emerson et al. (1975):

$$\text{pK} = 0,09018 + \frac{2729,92}{(273,2 + T)}$$

$$f_{\text{NH}_3} = \frac{1}{(1 + 10^{(\text{pK} - \text{pH})})}$$

pK = constante

T = temperatura em Kelvin

pH = potencial hidrogeniônico

f_{NH_3} = fração de NH_3

Em todas as amostragens, os peixes foram rapidamente anestesiados em água com benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$). O sangue foi coletado por punção de vasos caudais, com seringa sem anticoagulante, e separado em três baterias de microtubos. Para a obtenção de sangue total, utilizou-se o anticoagulante heparina nos microtubos. Este sangue foi utilizado para a determinação do eritrograma e para a dosagem das espécies reativas de oxigênio (EROs). Em outra bateria de tubos, foi adicionado o anticoagulante Glistab-Labtest (EDTA 6 g/dL e fluoreto de potássio 12 g/dL) para a análise de glicose plasmática (Kit Labtest). Para a obtenção de soro, o sangue sem anticoagulante permaneceu em temperatura ambiente para coagulação, e após duas horas foi centrifugado em 3000rpm , por 5 min , a 10°C e, após separação, foi armazenado a 70°C negativos.

Após a retirada do sangue, os animais foram pesados e medidos em balança de precisão e ictiômetro, respectivamente.

Osmolaridade e pH das soluções de *Aloe vera*

A osmolaridade e o pH das soluções de *Aloe vera* utilizadas foram mensurados (n=4). Para determinar a osmolaridade foi utilizado o aparelho 5500 Vapor Pressure Osmometer, e para o pH o aparelho HI 9321 Microprocessor pH Meter.

Indicadores Hematológicos

O hematócrito, número de eritrócitos e a concentração de hemoglobina foram determinados no sangue total em contador automático de células sanguíneas (Celm CC550) de uso veterinário. Para cálculo de volume corpuscular médio (VCM) foram utilizados os valores de hematócrito e a contagem de eritrócitos (RBC) (LIMA et al., 1969), segundo a expressão:

$$\text{VCM } \mu\text{mm}^3 = \frac{\text{hematócrito (\%)}}{\text{RBC (milhões/mm}^3)} \times 10$$

Para o cálculo de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram utilizados os valores de hemoglobina total (Hb) e de hematócrito (Htc) (LIMA et al., 1969):

$$\text{CHCM (\%)} = \frac{\text{Hb total (g\%)}}{\text{Htc (\%)}} \times 100$$

Ensaio da atividade respiratória de leucócitos

Uma alíquota de sangue heparinizado foi utilizada para determinação da atividade respiratória dos leucócitos. A análise da atividade respiratória de leucócitos seguiu o protocolo de Anderson e Siwicki (1995), modificado por Biller (2008). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul

escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (KLEIN, 1990). A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Metrolab 1700) em comprimento de onda de 540nm.

Ensaio da atividade respiratória de leucócitos com *A. vera in vitro*

Um exemplar de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foi anestesiado em água com benzocaína (0,1 g L⁻¹), para coleta de sangue por punção de vasos caudais. O sangue foi coletado com seringa e utilizou-se o anticoagulante heparina. Foi usado 5 repetições para cada tratamento, sendo o tratamento controle o tampão PBS, e a seguir usado 0,01%, 0,02%, 0,05% e 0,1% de *Aloe vera*. Para a diluição dos tratamentos foi utilizado o mesmo tampão PBS. Foi colocado 100µL de sangue total em microtubos e acrescidos mais 100 µL dos tratamentos e incubados durante uma hora. Para cada tratamento utilizado foi feita uma amostra como branco sendo utilizado a água destilada ao invés do sangue e a seguir feito os mesmos procedimentos. Essa medida foi tomada para isolar qualquer leitura no espectrofotômetro que não fosse da atividade respiratória de leucócitos.

Após o período de incubação foi retirado 100 µL de cada amostra e utilizado a análise da atividade respiratória de leucócitos segundo o protocolo de Anderson e Siwicki (1995), modificado por Biller (2008). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (KLEIN, 1990). A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Metrolab 1700) em comprimento de onda de 540nm.

Esses resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas por teste de Duncan (5%) no programa estatístico SAS 9.2.

Análise Estatística

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4 x 4 + testemunha (nível inicial), tendo como fatores as concentrações de *Aloe vera* e os tempos de coleta. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas por teste de Tukey (5%) no programa estatístico SAS 9.2.

RESULTADOS

Nenhum peixe morreu durante o experimento e todos voltaram a se alimentar 24 horas após o transporte, sendo arraçoados duas vezes ao dia. A água utilizada, tanto no transporte como nas caixas de recuperação, apresentou valores médios de temperatura $27,74 \pm 2,02^{\circ}\text{C}$, pH $7,25 \pm 0,54$ e concentração de oxigênio dissolvido $6,92 \pm 1,03$ mg/L. No período de recuperação a amônia não-ionizada se manteve baixa devido ao sistema de renovação aberto (0,03 mg/L). A concentração de amônia não-ionizada (NH_3) se manteve constante entre os tempos de 2 e 4 horas, porém nesse período no tratamento controle ocorreu uma maior excreção da amônia. (Figura 2).

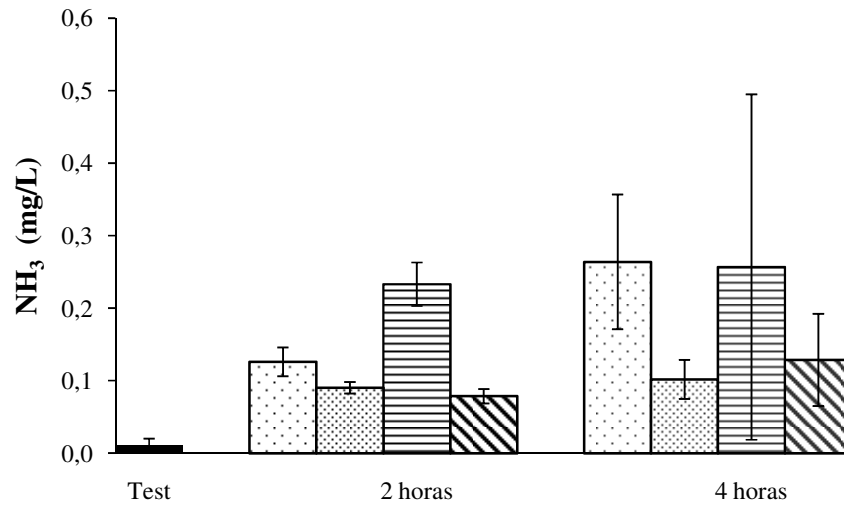


Figura 2. Concentração de NH₃ antes (basal), durante e após o transporte nos tratamentos de *Aloe vera*. Testemunha (■), controle (□), T1(▣), T2 (▤) e T3 (▥). Barras verticais representam desvio padrão da média.

Na figura 3 observa-se que a osmolaridade aumentou significativamente com o aumento da concentração de *Aloe vera*, enquanto o pH mostrou perfil oposto ao da osmolaridade, diminuindo conforme aumentou a concentração de *Aloe vera*.

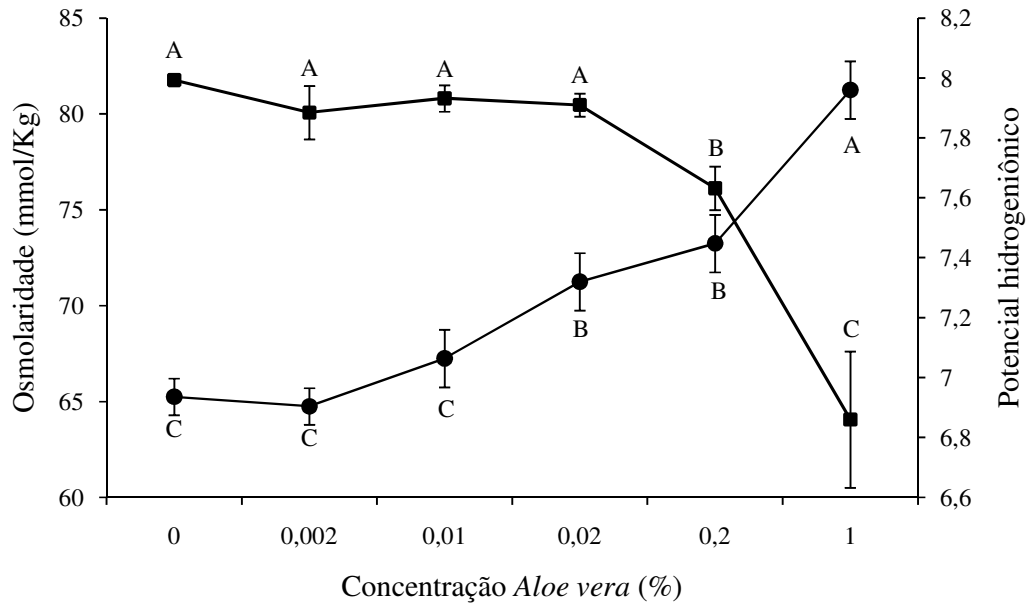


Figura 3. Osmolaridade (●) e potencial hidrogeniônico (■) das concentrações de *Aloe vera*. Letras indicam diferença entre as concentrações e barras verticais representam desvio padrão da média.

Os valores de glicemia não foram significativamente diferentes entre os tratamentos, apenas entre os tempos de coleta, apresentando um aumento diretamente relacionado ao tempo de transporte, com o maior valor em 4 horas de transporte, e retorno aos valores iniciais após 24 e 96 horas de recuperação (Figura 4).

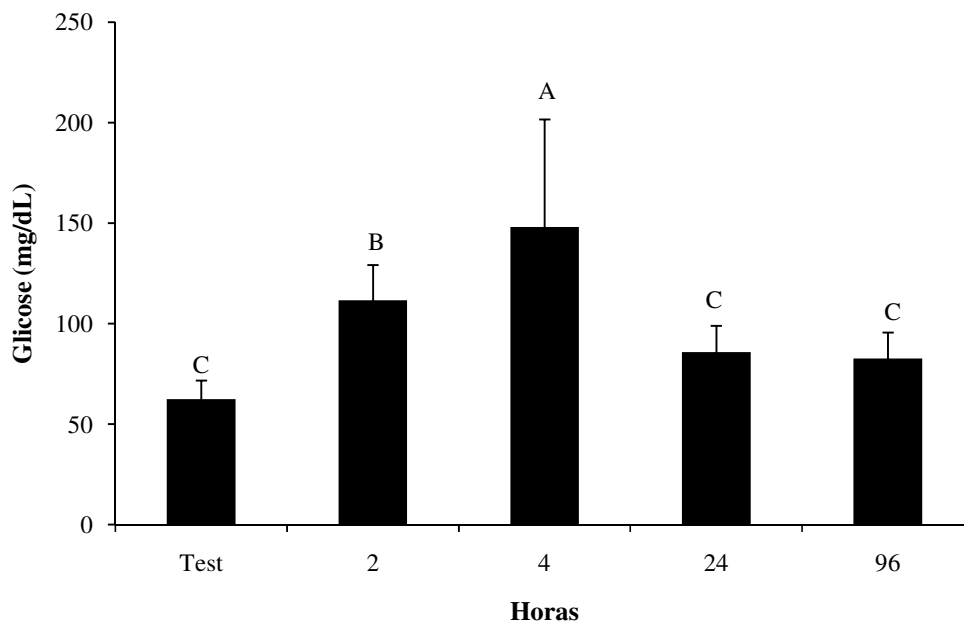


Figura 4. Glicemia de matrinxã antes, durante e após o transporte. Letras indicam diferença entre os tempos e barras verticais representam desvio padrão da média. Na ausência de diferença entre os tratamentos os valores foram agrupados.

O hematócrito (Figura 5) não diferiu significativamente entre os tratamentos, nem entre os tempos de coleta. O número de eritrócitos também não diferiu entre os tratamentos, mas foi maior na chegada e menor em 96 horas de recuperação (Figura 5). Do mesmo modo, o volume corpuscular médio (VCM) não diferiu entre os tratamentos, mas apresentou o maior valor em 96 horas, que diferiu de todos os demais, inclusive da testemunha. Na chegada do transporte, verificou-se o menor valor, que não diferiu apenas dos valores iniciais. Os valores do VCM em 2 horas de transporte e 24 horas de recuperação foram intermediários e diferiram do tempo de chegada e de 96 horas de recuperação, sendo esse o maior valor VCM registrado (Figura 5).

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não diferiu significativamente entre os tratamentos, apenas entre os tempos de coleta analisados,

sendo maior apenas na chegada do transporte, quando comparada com os outros tempos (Figura 5). A concentração de hemoglobina em 4 horas de transporte apresentou um aumento em todos os tratamentos. O controle, juntamente com o tratamento 1 e 3 não diferiu entre os tempos, e somente o tratamento 2 foi menor em 96 horas de recuperação em relação ao tempo da chegada (Figura 6).

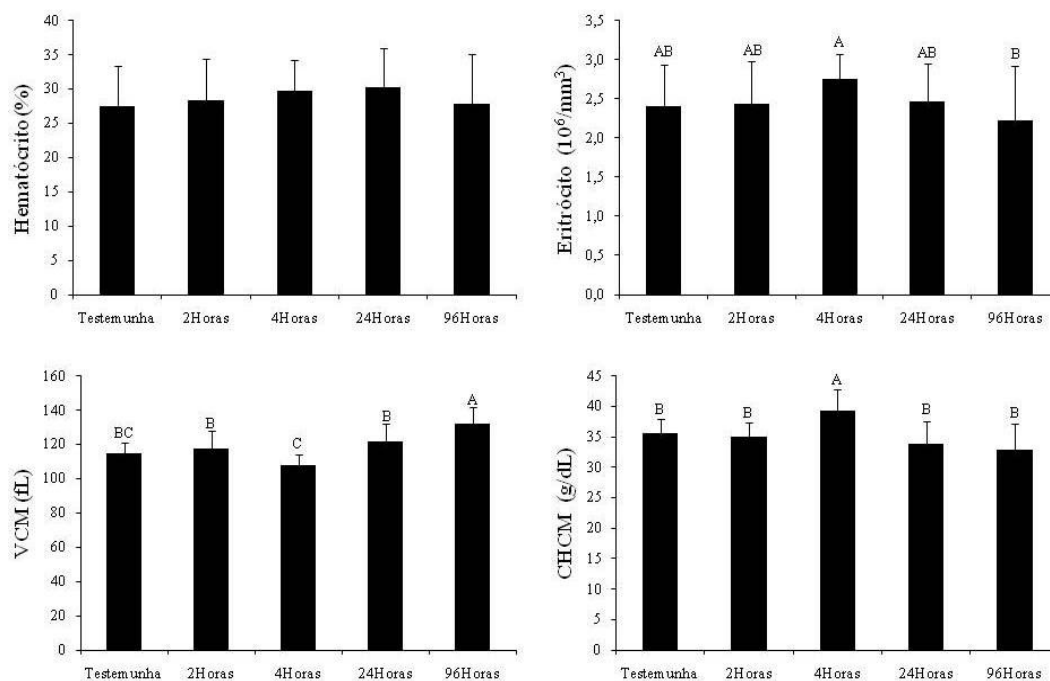


Figura 5. Hematócrito, número de eritrócito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de matrinxã antes, durante e após o transporte. Barras verticais representam desvio padrão da média. Na ausência de diferença entre os tratamentos os valores foram agrupados.

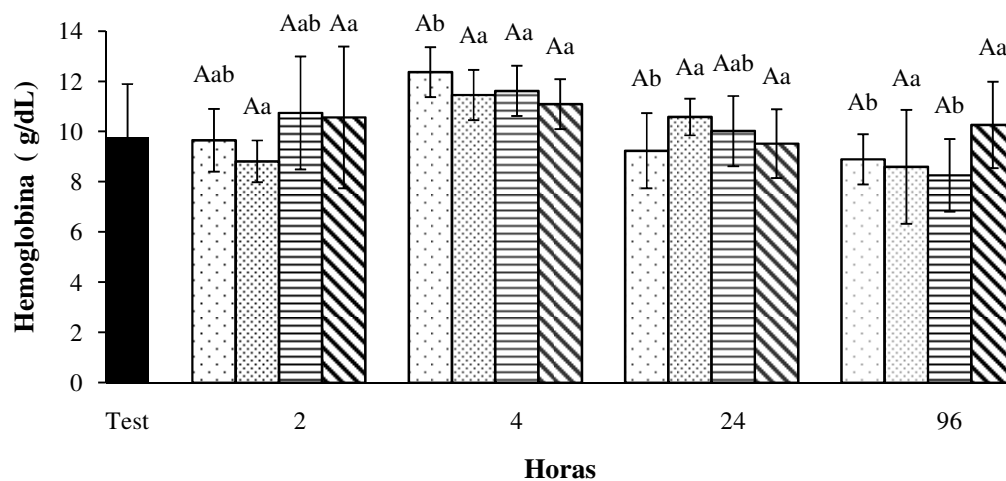


Figura 6. Concentração de hemoglobina de matrixã durante e após o transporte nos tratamentos com *Aloe vera*. Testemunha (■), C (□), T1 (▣), T2 (▤) e T3 (▥). Letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo tempo e minúsculas entre os tempo no mesmo tratamento. Condição inicial (testemunha); todos os tratamentos compartilham a mesma testemunha e as barras verticais representam desvio padrão da média.

A atividade respiratória de leucócitos, em 4 horas de transporte, mostrou uma redução em todos os tratamentos, e após esse tempo houve uma pequena recuperação. O controle não diferiu entre os tempos, porém verificou-se diferença entre os tempos de 2 e 4 horas para os tratamentos 2 e 3. Observou-se também, em 2 horas de transporte, que o tratamento 3 apresentou o maior valor de atividade respiratória sendo significativamente maior que no tratamento controle (Figura 7).

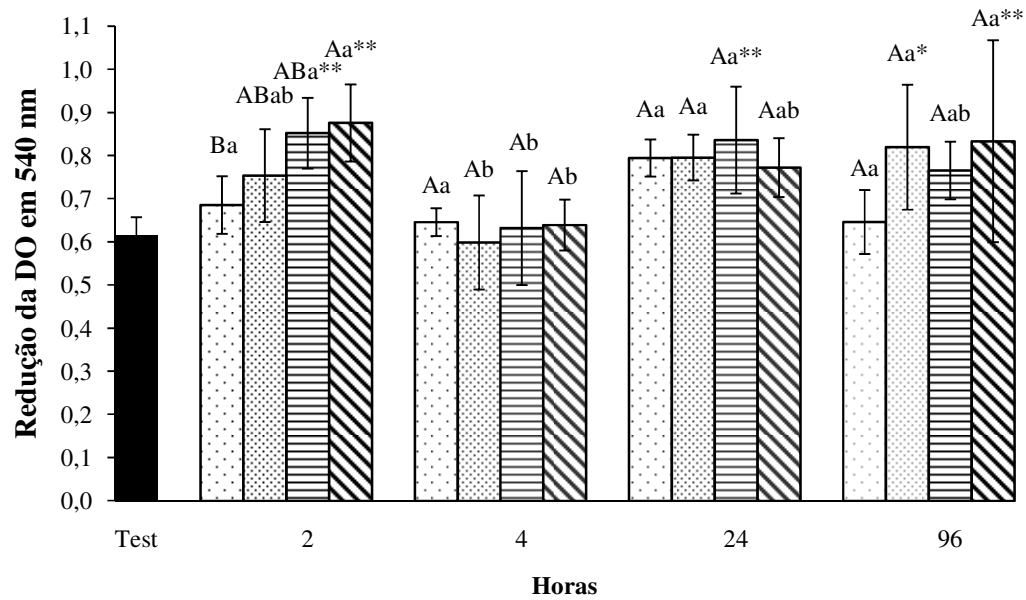


Figura 7. Atividade respiratória de leucócitos de matrinxã antes, durante e após o transporte nos tratamentos com *Aloe vera*. Testemunha (■), C (□), T1 (▤), T2 (▥) e T3 (▧). Letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo tempo e minúsculas entre os tempo no mesmo tratamento. Asteriscos simples e duplo indicam diferenças ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente) entre cada tratamento e a condição inicial (testemunha); todos os tratamentos compartilham a mesma testemunha e as barras verticais representam desvio padrão da média.

Todos os tratamentos demonstraram aumento da atividade respiratória de leucócitos testada *in vitro* com *Aloe vera*, em relação ao controle, porém somente o tratamento mais concentrado não diferiu significativamente. A maior atividade ocorreu com 0,02%, sendo significativamente maior que todas. As concentrações de 0,01% e 0,05% tiveram valores intermediários sendo maiores que o controle, porém menor que a concentração de 0,02% (Figura 8).

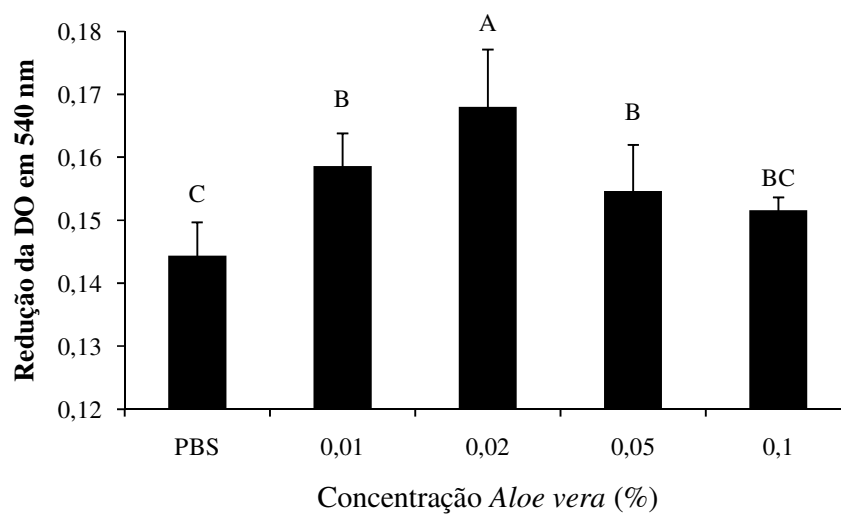


Figura 8. Atividade respiratória de leucócitos com tratamentos de 0,01%, 0,02%, 0,05% e 0,1% de *Aloe vera in vitro*, controle (PBS). Letras indicam diferença entre os tratamentos e barras verticais representam desvio padrão da média.

DISCUSSÃO

A qualidade da água no transporte de peixes vivos é um dos fatores que influenciam o estado fisiológico dos animais. Provavelmente devido a grande quantidade de substâncias encontradas na *Aloe vera* (CHOI e CHUNG, 2003), a água dos tratamentos teve sua osmolaridade alterada, podendo estar relacionada à alteração na excreção de amônia nos diferentes tratamentos. Alteração na excreção de amônia foi

descrita no transporte de matrinxã com uso de NaCl na água (CARNEIRO e URBINATI, 2001).

A redução do pH nas soluções de *Aloe vera* diminui diretamente a fração da amônia não-ionizada na água, segundo Emerson et al. (1975), ou seja quanto mais baixo o pH, menor é a fração da amônia não-ionizada na água, fazendo com que isso colabore, juntamente com a osmolaridade para uma menor concentração da amônia não-ionizada na água encontrada nos tratamentos.

A elevação dos níveis glicêmicos durante o transporte confirma a condição de estresse desencadeada pelo transporte e a necessidade de energia para suportar a situação adversa. Este aumento, nos casos de estresse, tem origem glicogenolítica proveniente da ação das catecolaminas e corticosteróides (MOMMSEN et al., 1999), sendo indicador confiável de estresse em peixes (WENDELAAR BONGA 1997). Neste trabalho, não houve diferença nesta variável fisiológica entre os tratamentos, porém os peixes de todos os tratamentos apresentaram hiperglicemia após a chegada. A redução dos níveis de glicose 24 e 96 horas após o término do transporte indica recuperação fisiológica. Resultado semelhante foi observado na mesma espécie em procedimento de transporte (CARNEIRO e URBINATI, 2001; URBINATI et al., 2004).

O estresse de transporte, de captura e a superpopulação pode alterar o padrão característico do eritrograma em teleósteos dulciaquícolas e marinhos (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004) e as variáveis hematológicas podem ser indicadoras de distúrbios físicos e processos fisiológicos em peixes (FABBRI et al., 1998). No presente estudo, as alterações decorrentes do estresse não foram consistentes, tornando complexa a interpretação dos resultados.

No estresse agudo, por ação adrenérgica, ocorre aumento do número de células vermelhas e concentração de hemoglobina (WEDEMEYER, 1996) e sua afinidade pelo

oxigênio (AOTA et al., 1990), outro tipo de resposta secundária de estresse mais severa é a dilatação dos vasos sanguíneos branquiais, por aumento da pressão sanguínea, para aumentar a perfusão das lamelas e captação de oxigênio. Esse aumento da perfusão das lamelas leva a permeabilidade do epitélio branquial, que possibilita perda de íons sódio e cloreto do sangue para o meio externo, esse gradiente também faz com que ocorra influxo de água por osmose, promovendo uma hemodiluição, resultando em menor hematócrito, número de eritrócitos e concentração de hemoglobina (URBINATI e CARNEIRO, 2004).

Mesmo sem diferença entre os tratamentos houve um aumento numérico no número de eritrócitos na chegada, provavelmente devido aos efeitos do estresse. Injeção de cortisol aumentou o consumo de oxigênio em trutas (MORGAN e IWAMA, 1996) e em carpas elevou o volume e número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina (WOJTASZEK et al., 2002). O número elevado de eritrócitos na circulação sugere liberação dessas células pelo baço (PULSFORD et al., 1994), um dos principais sítios eritopoiéticos em teleosteos. Carneiro e Urbinati (2001) encontraram resultados similares no transporte de *Brycon cephalus*, onde a hemoglobina e o CHCM elevaram-se com o transporte, mas o número de eritrócito decresceu 24 horas após esse procedimento.

Não foi observado diferença entre os tratamentos na concentração de hemoglobina, porém apresentou diferença entre os tempos. Assim, durante o estresse, o aumento da hemoglobina sugere maior capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, na tentativa de suprir o aumento da demanda energética (NIKINMAA et al., 1983).

Os macrófagos desempenham um papel importante no mecanismo de defesa do hospedeiro. Quando ativados, inibem o crescimento de uma ampla variedade de células tumorais e de microorganismos. Macrófagos geram grandes quantidades de EROS,

em resposta a um variedade de estímulos na membrana, por uma sequência coordenada de reações bioquímicas conhecidas como o burst oxidativo (ZHANG et al., 2006).

Na atividade respiratória de leucócitos nota-se que no tempo de 4 horas de transporte houve uma queda geral em todos os tratamentos, sugerindo uma menor atividade dos macrófagos, e após esse tempo observou-se uma pequena recuperação. Como na chegada temos o pico do agente estressor, o cortisol liberado causa uma imunossupressão (WENDELAAR BONGA 1997). Contudo, nota-se em 2 horas de transporte que a atividade aumenta com o aumento da concentração de *Aloe vera*, sugerindo efeito da *A. vera* na atividade respiratória de leucócitos. Isso indica que a *Aloe vera* pode ter interagido com receptores de membranas de neutrófilos, monócitos e macrófagos, como as bactérias também o fazem, estimulando a produção e aumento de EROs produzidos por essas células. O aumento na produção de EROs é um indicador da ativação do sistema imune não específico em peixes (JENEY e ANDERSON, 1993; JORGENSEN e ROBERTSEN, 1995).

O presente estudo testou a ação da *Aloe vera in vitro*, com células no sangue total, em pacu, e observou-se o mesmo efeito verificado *in vivo*. Houve aumento da atividade respiratória dos leucócitos, demonstrando assim sua ação imunoestimulante. Resultados semelhantes também foram encontrados por Zhang et al. (2006), quando isolaram duas hidrocumarina presentes na *Aloe vera* e testaram na atividade respiratória dos macrófagos de rato, aumentando assim sua produção de EROs. Sjeraba e Quere (2000) também encontraram resultados semelhantes, utilizando um composto isolado da *Aloe vera*, o acemanano, para aumentar a ativação dos macrófagos.

Esse aumento gradativo da atividade respiratória de leucócito, seguindo a concentração de *Aloe vera*, indica que o produto entrou em contato com os leucócitos na circulação. Esse processo pode ter ocorrido pelo mesmo mecanismo em que os

anestésicos são absorvidos pelos peixes. Segundo Ross e Ross (2008) a solução é ventilada, pelo peixe e moléculas da droga difundem rapidamente nos espaços de sangue nas lamelas secundárias, que drenam o sangue arterial eferente. Outra forma de absorção é direta pela ingestão das partículas suspensas na solução.

Os resultados encontrados neste estudo confirmam que o manejo do transporte foi estressante, e que o momento crítico foi na chegada quando ocorre a maior glicemia, menor atividade respiratória de leucócito e menor concentração de hemoglobina. A adição de *Aloe vera* na água de transporte não alterou a resposta metabólica de estresse investigada, mas potencializou a resposta imunológica não específica, pois o acréscimo na atividade dos macrófagos aumenta a chance do peixe ter sucesso contra um patógeno.

REFERÊNCIAS

- AMEND, D.F.; CROY, T.R.; GOVEN, B.A.; JOHNSON, K.A.; McCARTHY, D.H. Transportation of fish in closed systems: methods to control ammonia, carbon dioxide, pH, and bacterial growth. Transactions of American Fisheries Society v.111, p.603-611, 1982.
- AOTA, S.; HOLMGREN, K.D.; GALLAGHER, P. A possible role for catecholamines in the ventilator responses associated with internal acidosis or external hypoxia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Experimental Biology, v.151, p.51-57, 1990.
- ARTS, M.T.; BRETT, M.T.; KAINZ, M.J. Lipids in Aquatic Ecosystems, Springer, New York, 395p, 2009.

BARTON, B.A.; PETER, R.E. 1982. Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to various transport conditions, anaesthesia, and cold shock. *Journal of Fish Biology*, v.20, p.39–51, 1982.

BENDACK, F.; URBINATI, E.C. Calcium sulfate as stress reducer in matrinxã *Brycon amazonicus* transportation. *Journal of Applied Ichthyology*, v.25, p.105-109, 2009.

BILLER, J.D. Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila*, em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β -glucano. 2008. 106p. Dissertação (Mestre em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

CARMICHAEL, G.J.; TOMASSO, J.R.; SIMCO, B.A.; DAVIS, K.B. Characterization and alleviation of stress associated with hauling largemouth bass. *Transactions of American Fisheries Society*. v.113, p. 778-785, 1984.

CARMICHAEL, G.J.; WEDMEYER, G.A.; MCCRAEN, J.D.; MILLARD, J.L. Physiological effects of handling and hauling stress on smallmouth bass. *The Progressive Fish-Culturist*, v.45, p. 110–113, 1983.

CARNEIRO, P.C.F. Estresse provocado pelo transporte e repostas fisiológicas do matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae). Tese (Doutorado em Aquicultura). Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 137p, 2001.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research*. v.32, p.297-304, 2001.

CHOI, S.; CHUNG, M.H. A review on the relation between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*, v.1, n.1, p.53-62, 2003.

CHOI, S.; SON, B.W.; SON, Y.S. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from *Aloe vera*. *British Journal of Dermatology*, 2001.

DAVIS, R.H.; DONATO, J.J.; HARTMAN, G.M. Anti-inflammatory and wound healing activity of a growth substance in Aloe vera. Journal of the American Podiatric Medical Association, p.77-81, 2001.

EMERSON, K. ; RUSSO, R.C. ; LUND, R.E. ; THURSTON, R.V. Aqueous ammonia equilibrium calculations : effects of pH and temperature. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. v.32, p.2379-2383, 1975.

FABBRI, E.; CAPUZZO, A.; MOON, T.W. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, v.120, p.177-192, 1998.

FERRAZ, F.B.; GOMES, L.C. Social relationship as inducer of immunological and stress responses in matrinxã (*Brycon amazonicus*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v.153 p.293–296, 2009.

GOMES, L.C.; ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; CHIPARRI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; URBINATI, E.C. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. Journal of World Aquaculture Society, v.34, p.76-84, 2003.

GOMES, L.C.; URBINATI, E.C. Criação de matrinxã. In: BALDISSEROTTO, B; GOMES, L.C. (Org.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria v. 1, p.149-174, 2005.

GRAEF, E.W.; RESENDE, E.K., PETRY, P.; STORTI-FILHO, A. Policultivo de matrinxã (*Brycon* sp) e jaraqui (*Semaprochilodus* sp) em pequenas represas. Acta Amazônica, v.17, p.33-42, 1987.

GROTTUM, J.A.; STAURNES M.; SIGHOLT, T. Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), kept at high densities during transport. Aquaculture Research, v.28, p.159-164, 1997.

HE, S.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; SHI, P.; YAO, B.; RING, E.; YOON, I. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community, Aquaculture, 2009. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.043.

HOSHIBA, M.A., GONÇALVES, F.D., URBINATI, E.C. Respostas fisiológicas de estresse do matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso, durante a captura. Acta Amazonica v.39(2): p.445–452, 2009.

HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). Bulletin of the British Museum of Natural History and Zoology, v.43, p.1-47, 1982.

IM, S.A.; OH, S.T.; SONG, S.; KIM, M.R.; KIM, D.S.; WOO, S.S.; JO, T.H.; PARK, Y.I.; LEE, C.K. Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. International Immunopharmacology. v. 5, p. 271-279. 2005.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; NILSSEN, K. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. Aquaculture v.168, p. 387–394, 1998.

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, v.116, p.315-319, 1993.

JOHNSON, D.L.; METCALF, M.T. Causes and control of freshwater drum mortality during transportation. Transactions of American Fisheries Society, v.111, p.58–62, 1982.

JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Yeast C-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. Developmental and Comparative Immunology, v.19, p.43-57, 1995.

KIM, K.H.; HWANG, Y.J.; BAI, S.C. Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish *Sebastes schlegelii* fed diets containing different doses of aloe. *Aquaculture*, v.180, p. 13–21, 1999.

KLEIN, J. *Immunology*. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc. p.311-334, 1990.

KUBITZA, F. Transporte de peixes vivos. Parte 1. *Panorama da Aqüicultura*, v.7, p. 20–26, 1997.

MAZIK, P.M.; SIMCO, B.A.; PARKER, N.C. Influence of water hardness and salts on survival and physiological characteristics of striped bass during and after transport. *Transactions of American Fisheries Society*, v.120, p.121-126, 1991.

McDONALD, D.G.; GOLDSTEIN, M.D.; MITTON, C. Responses of hatchery-reared brook trout, lake trout, and splake to transport stress. *Transactions of American Fisheries Society*, v. 122, p. 1127–1138, 1993.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 9, p. 211-268, 1999.

MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Cortisol induces changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.15, n.5, p.385-394, 1996.

NIKINMAA, M.; SOIVIO, A.; NAKARI, T.; LINDGREN, S. Handling stress in brown trout (*salmo trutta*): physiological response to transport in fresh water or salt water, and recovery in natural brackish water. *Aquaculture*, v.34, p. 93-99, 1983.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. *Aqüicultura no Brasil: O desafio é crescer*. Brasília, 276p, 2008.

PATENT STORM. <http://www.patentstorm.us/patents/4500510/claims.html>. Damaged fish tissue treating method and composition containing Aloe vera extract. Acessado em 24 de outubro de 2009.

PAVILIDIS, M.; ANGELLOTTI, L.; PAPANDROULAKIS, N.; DIVANACH, P. Evaluation of transportation procedures on water quality and fry performance in red porgy (*Pagrus pagrus*) fry. *Aquaculture*, v.218, p.187-202, 2003.

PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G.; CHRISTIE, P. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *Journal of Fish Biology*, v.20, p.229-244, 1982.

PULSFORD, A.L.; LEMAIRE-GONY, S.; TOMLINSON, M.; COLLINGWOOD, N.; GLYNN, P.J. Effects of acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.109, p.129-139, 1994.

RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.4, p.229-288, 1996.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C.R.; TRANT, J.M. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling transport, rearing density, and a disease outbreak. *The Progressive Fish-Culturist*, v. 49, p. 1–12, 1987.

ROSS, L.G.; ROSS, B. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*, 3rd ed, 218p, 2008.

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

SAKS, Y., BARKAI-GOLAN, R. *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. *Postharvest Biology and Technology*, v.6, p.159–165, 1995.

SANDODDEN, R.; IVERSEN, M. Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): anaesthesia e recovery. *Aquaculture Research* v.32, p.87-90, 2001.

SERRA, M.; WOLKERS, C.P.B.; URBINATI, E.C. Influência da suplementação da ração com cortisol no comportamento de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*). Anais do Congresso Aquacultura 2008. Maringá - PR, 2008.

SJERABA, A.; QUERE, P. In vivo macrophage activation in chickens with acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. Journal of Immunopharmacology, v.22, p.365, 2000.

SPECKER, J.L.; SCHRECK, C.B. Stress response to transportation and fitness for marine survival in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) smolts. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 37, p.765–769, 1980.

STAURNES, M.; SIGHOLT, T.; PEDERSEN, H.P.; RUSTAD, T. Physiological effects of simulated high-density transport of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquaculture, v.119, p.381– 391, 1994.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos, 144p, 2004.

TUCKER, C.S. Channel catfish culture. Amsterdam: Elsevier, 675p, 1985.

URBINATI, E.C.; ABREU, J.S.; CAMARGO, A.C.S.; LANDINEZ, M.A. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. Aquaculture, v. 229, p. 389–400, 2004.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus*, (Teleostei: Characidae) to transport stress under influence of benzocaine. Journal of Aquaculture in the Tropics, v.16, p.75-85, 2001.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (editores). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Ed: TecArt, 533p, 2004.

WEDEMEYER, G.A. Physiology of fish in intensive culture systems. New York, Chapman e Hall, 232p, 1996.

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

WOJTASZEK, J.; DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D.; LOZINSKA-GABSKA, M.; ADAMOWICZ, A.; DZUGAJ, A. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Ciprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. *General and Comparative Endocrinology*, v. 125, p. 176-183, 2002.

WURTS, W.A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. *World Aquaculture*, v.26, p.80-81, 1995.

YAGI, A.; KABASH, A.; OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; MOUSTAFA, S.M.; KHALIFA, T.I. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. *Planta Medicinal*, v.68, p.957-960, 2002.

YAGI, A.; KABASH, A.; MIZUNO, K.; MOUSTAFA, S.M.; KHALIFA, T.I.; TSUJI, H. Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 synthase from *Aloe vera* gel. *Planta Medicinal*, v.69, p.269-271, 2003.

ZHANG, X-f.; WANG H-m.; SONG, Y-f.; NIE, L-h; WANG, L-f.; SHEN P-p.; LIU, Y. Isolation, structure elucidation, antioxidative and immunomodulatory properties of two novel dihydrocoumarins from *Aloe vera*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, p.949-953, 2006. doi:10.1016/j.bmcl.2005.10.096

CAPÍTULO 3

A Aloe vera NA RECUPERAÇÃO DE MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*) APÓS A
REPRODUÇÃO INDUZIDA

ABSTRACT

The study evaluated the effect of *Aloe vera* on metabolic (glucose), immunological (respiratory activity of leukocytes and lysozyme) and hematological (hematocrit, hemoglobin, total count and volume of erythrocytes) response of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders after the handling of hormonal spawning induction. After the induction procedure, breeders were exposed to three treatments with *Aloe vera* (0% - C, 0.01% - T1, 0.02% - T2) and were observed for 72 hours. The fish exposure to *A. vera* solutions lasted 36 hours. Blood samples were collected before (Test), after hormonal induction (AP), and 72 hours after spawning. Blood hematocrit, erythrocyte count, hemoglobin concentration and respiratory activity of leukocytes, plasma glucose and serum concentration of lysozyme were determined. After spawning, fish liver showed an accumulation of lipid that might originate from the visceral fat normally stored as an energy source for the reproduction migration process. The females showed higher amount of liver lipid probably due to the oocytes resorption. The high mortality of fish that lost mucus cells after spawning handling suggests the importance of preserving the epithelial layer in the fish skin. Plasma glucose increased significantly after spawning, without difference among treatments. The respiratory activity of leukocytes decreased after spawning induction compared to the basal condition but *Aloe vera* treatments improved the leukocytes response although the values of respiratory burst did not reach the basal levels.

Keywords: *Aloe vera*, matrinxã, immune response, induced spawning.

RESUMO

O trabalho verificou o efeito da *Aloe vera* nas respostas metabólica (glicose), imunológicas (atividade respiratória de leucócitos e da lisozima) e hematológicas (hematócrito, hemoglobina, contagem total e volume de eritrócitos) de reprodutores de matrinxã (*Brycon amazonicus*) após o manejo de indução hormonal da desova. Após o procedimento da indução de desova, os reprodutores foram submetidos a três tratamentos de *Aloe vera* (0% - C; 0,01% - T1; 0,02% - T2) e foram observados durante 72 horas, sendo que os banhos com o extrato de *A. vera* duraram 36 horas. Amostras de sangue foram coletadas antes (Test), depois da indução hormonal (AP), e 72 horas depois da desova. No sangue total foram determinados hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e atividade respiratória de leucócitos, no plasma a glicose e no soro a concentração da lisozima. Após a reprodução, o fígado dos peixes apresentaram um acúmulo de gordura provavelmente proveniente de gordura visceral depositada como reserva de energia não utilizada para a migração da reprodução. As fêmeas apresentaram uma pequena diferença nesse acúmulo devido a reabsorção dos vitelos. A alta mortalidade dos peixes que tiveram perda das células de muco após reprodução sugere a importância de se preservar a camada epitelial no manejo da reprodução. A glicemia aumentou significativamente após a desova, devido ao manejo da reprodução, sem diferença entre os tratamentos. A atividade respiratória de leucócitos foi mais elevada na coleta basal, e diminuiu após a indução hormonal devido a imunossupressão causada pelo estresse. Os peixes tratados com *Aloe vera* tiveram significativo aumento na atividade respiratória de leucócitos em relação ao controle, esse aumento também foi observado na atividade respiratória de leucócitos *in vitro*, em sangue total de pacu.

Palavras-chaves: *Aloe vera*, matrinxã, resposta imunológica, reprodução induzida.

INTRODUÇÃO

A reprodução representa uma etapa muito importante da tecnologia da produção de peixes em sistemas de criação. Entretanto os fatores envolvidos na regulação da reprodução em peixes são extremamente complexos e ainda faltam informações a respeito dos fatores bióticos e abióticos que interferem no sucesso do processo (LEATHERLAND et al., 1998; MYLONAS et al., 2009).

Como a maioria das espécies brasileiras com potencial para produção é reofílica, sua reprodução é dificultada em condições de criação (MYLONAS et al., 2009), sendo necessário a utilização de hormônios estimulantes para a maturação final dos gametas (NARAHARA et al., 1994).

O evento natural da reprodução é bastante estressante para o peixe (SCHRECK, 2009), e na reprodução artificial, com indução hormonal da desova, somam-se o manejo de seleção e captura, pesagem, soltura nas caixas, aplicação de hormônios, extrusão dos oócitos e espermição, o que faz com que essa etapa esteja sempre associada a quadro típico de estresse em que ocorre imunossupressão (PICKERING, 1986), aumento da susceptibilidade a doenças (PICKERING e CHRISTIE, 1980), e alta mortalidade após desova, principalmente de fêmeas (MILLS, 1971; SCHRECK et al., 2001).

Pesquisadores brasileiros têm mostrado interesse pela reprodução induzida de espécies nativas (BERNARDINO et al., 1993; ANDRADE-TALMELLI et al., 2002; NARAHARA et al., 2002; LEONARDO et al., 2004; BATLOUNI et al., 2006; ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007), e, embora haja trabalhos sendo desenvolvidos, ainda são necessários estudos para o aprimoramento das técnicas de indução da reprodução e recuperação das matrizes que morrem em grande número após o processo de indução hormonal. Segundo Senhorini (comunicação pessoal), a

formação da matriz de matrinxã demora em torno de 2 a 3 anos e custa ao produtor cerca de R\$ 150,00.

A reprodução inicia-se a partir da estimulação do hipotálamo, por fatores externos, fazendo com que tenha início o processo de desenvolvimento gonadal (Figura 9).



Figura 9. Produção de hormônios e sua atuação nas diferentes estruturas reprodutivas de peixes migradores brasileiros (adaptado de Cyrino et al., 2004).

Esse processo desenvolve nos peixes as características sexuais secundárias, que tornam possível a diferenciação entre machos e fêmeas. A fêmea apresenta abdômen dilatado e macio com papila genital intumescida e avermelhada e a seleção do macho é feita através de pressão abdominal, de modo que os peixes maduros eliminam pequenos volumes de sêmen e aspereza nas nadadeiras ventrais (WOYNAROVICH e HORVÁTH, 1983; ZANIBONI-FILHO e NUÑER, 2004, ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007).

O completo desenvolvimento dos gâmetas nas fêmeas em sistema de criação só é possível se forem aplicadas substâncias que irão desencadear estímulos na hipófise desses animais ou em nível gonadal, já para os machos a aplicação de hormônio aumenta o volume de sêmen. A utilização do extrato bruto da hipófise de peixes adultos continua sendo a técnica mais utilizada para a indução hormonal da maturação final

(HARVEY e CAROSFELD, 1993; ZANIBONI-FILHO e NUÑER, 2004, GOMES e URBINATI, 2005; ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007).

Durante o manejo da reprodução artificial, ocorrem danos no peixe como lesões na pele e perda de muco, em decorrência do contato do animal com a rede, com outros peixes e principalmente com as mãos do técnico, no momento da extrusão dos ovos nas fêmeas, e espermição nos machos.

A pele é uma estrutura muito importante por ser, juntamente com o muco e as escamas, a barreira natural que o peixe dispõe contra a invasão de patógenos. Sua estrutura varia entre as espécies, mas basicamente é dividida em duas camadas, uma externa, a epiderme e outra interna a derme (HIBIYA, 1984). A epiderme de peixes é uma camada multifuncional, constituída de vários tipos celulares, com diferentes formas e posições, e presumidamente funções (ZACCONE et al., 2001). Há discussões sobre nomenclatura e funções dos tipos de células presente na epiderme e seus produtos, como muco, secreções serosas, e venenosas. Whitear (1986) classificou vários tipos de células em peixes, como: epiteliais, sensoriais, células de Merkel, transportadoras de íons, granulares, venenosas e células de muco, os quais tem sido alvo de estudos da histologia e histoquímica.

A epiderme pode ser dividida em duas camadas, a basal e a celular. As células de muco estão presentes na epiderme, e tem várias funções, como: comunicação, locomoção, regulação osmótica, iônica, e ela também cria uma camada escorregadia em volta do corpo do peixe, fazendo com que essa camada proteja o peixe da invasão de patógenos, sendo a primeira linha de defesa do corpo. Além de ser uma barreira física, o muco produzido por estas células também possui imunoglobulinas, toxinas e enzimas como a lisozima, que atua contra os patógenos (FAST et al., 2002).

As células de muco podem ser de três tipos e variam de espécie para espécie, podendo também variar a composição do muco de acordo com as mudanças fisiológicas e ambientais (ZACCONE et al., 2001). A exposição a detergente, pesticidas, águas ácidas ou salgadas, aumenta a produção de muco, como também sua composição química (ZACCONE et al., 1989; IGER e WENDELAAR-BONGA, 1994; IGER et al., 1994a, b).

A derme é espessa e consiste principalmente de colágeno (SOUZA et al., 2003). Nessa camada, estão presentes as escamas e células de pigmento que podem ser de cinco tipos diferentes: melanóforo, eritróforo, xantóforo, leucóforo e iridóforo (HIBIYA, 1984).

De acordo com observações de rotina na criação do matrinxã, a espécie perde escama mais facilmente quando comparada com outras espécies, provavelmente devido ao fato da sua derme ser menos espessa, local onde é fixada a escama (ZAIDEN, S. F. comunicação pessoal).

Além da pele, o fígado é outro órgão afetado na reprodução, tendo em vista que uma das suas funções é metabolizar e degradar hormônios, entre os quais os hormônios atuantes no processo da reprodução (HIBIYA, 1984). Outra importante função é armazenar glicogênio como fonte de energia, principalmente na reprodução, quando ocorre uma alta demanda energética. O fígado é composto pelas células conhecidas como hepatócitos e uma matriz de fibras que funciona como suporte para a rede celular. É muito importante no metabolismo de proteína, lipídeos e carboidratos, além de armazenar energia e ser responsável pela desintoxicação.

Alguns estudos em mamíferos mostram que a *Aloe vera*, possui importantes propriedades terapêuticas como anti-inflamatória (YAGI et al., 2002), imunestimulante (IM et al., 2005; SJERABA e QUERE, 2000), além de atividade

cicatrizante (DAVIS et al., 2001; CHOI et al., 2001), entretanto muito pouco se sabe sobre o uso desta planta em peixes, embora o uso do extrato como método para reparar danos em tecidos de peixes tenha sido patenteado em 1985 (PATENT STORM, 1985). Estudo mostrou efeito positivo da suplementação dietária com *A. vera* no controle da infestação de *Sebastes schlegeli* com *Vibrio alginolyticus* (KIM et al., 1999). Considerando as propriedades da *A. vera*, seu uso pode ser útil na recuperação das matrizes de matrinxã após a reprodução. O presente trabalho verificou o efeito de tratamento com a *Aloe vera*, na forma de banhos, na recuperação de respostas estressantes e das injúrias causadas pelo manejo de indução hormonal em reprodutores de matrinxã (*Brycon amazonicus*), por meio de respostas metabólica, imunológicas, hematológicas e na recuperação das lesões teciduais da pele, bem como seu efeito no fígado.

MATERIAL E MÉTODOS

Local, animais e indução hormonal

O experimento foi realizado no Centro de Aqüicultura da UNESP, no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal, e no CEPTA/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – Pirassununga - SP.

Os peixes ($860,86 \pm 87,84\text{g}$, $41,28 \pm 1,38\text{cm}$) utilizados eram provenientes de plantel do Instituto Chico Mendes, selecionados pelos caracteres sexuais secundários evidentes no período de maturação (volume e flacidez ventral das fêmeas e espermiacão dos machos). Os peixes foram transportados para dois tanques de contenção, em laboratório, com água corrente, sendo 18 machos e 21 fêmeas separados por sexo. As

fêmeas receberam extrato de pituitária de carpa (EPC), em duas aplicações, sendo a primeira de 0,5 mg/kg, (dose preparatória) e, após intervalo de 8 horas, a segunda de 5,0 mg/kg (dose decisiva). Os machos receberam uma única dose de EPC (1,0 mg/kg), logo após a segunda aplicação do extrato nas fêmeas. As injeções de EPC foram administradas intraperitonealmente, tendo como veículo solução salina (0,5-1,0 mL/kg). Foi registrada a temperatura da água para determinação da unidade térmica acumulada (UTA) e o momento exato para a extrusão dos gametas a qual foi realizada por massagem na região ventral dos reprodutores.

Solução da *Aloe vera*

Os tratamentos foram definidos após a realização de um experimento piloto que estabeleceu as concentrações 0,01%, e 0,02%. A *Aloe vera* PÓ 200:1 SPRAY DRIED (Jungconsult do Brasil Produtos Naturais Ltda) foi obtida a partir do gel claro e cristalino de folhas frescas de *Aloe vera* obtido por um processo de extração, purificação e concentração. Este concentrado é seco pelo sistema “spray dried”. Cada parte de pó é produzido a partir de 200 partes de gel interno de *Aloe vera*.

Delineamento Experimental

Após o procedimento de indução hormonal de desova, teve início o experimento propriamente dito com o uso do extrato de *A. vera*. Foram utilizados 39 peixes no total. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com um controle e dois tratamentos de *Aloe vera* (0% - C; 0,01% - T1; 0,02% - T2), e três repetições por tratamento. Foram utilizadas nove caixas de polietileno com capacidade de 500 litros dispostas em sistema de circulação fechada, para que a *Aloe vera* diluída na água continuasse no sistema.

Após o manejo da desova induzida, os peixes foram colocados nas caixas para aplicação dos diferentes tratamentos (quatro machos e cinco fêmeas para cada tratamento), e foram observados durante 72 horas, sendo que os banhos com o extrato de *A. vera* duraram 36 horas, quando a circulação de água foi ligada, para minimizar as alterações na qualidade da água.

As amostragens ocorreram como descrito a seguir: seis peixes foram capturados no viveiro - grupo Test (três machos e três fêmeas); outros seis peixes foram amostrados depois do manejo da reprodução - grupo AP (três machos e três fêmeas); nove peixes do tratamento controle, nove peixes do T1 e nove peixes do T2 foram amostrados no período de 72 horas a partir da desova. Neste período, os peixes foram observados para que, em caso de ocorrência de animais prestes a morrer (abdome para cima), estes fossem amostrados para extração de sangue e tecidos. Ao completar o período de 72 horas após a desova, os peixes restantes passaram pelo mesmo procedimento.

Coletas e análises laboratoriais

Após biometria (peso e comprimento total), os exemplares foram fotografados, e mortos com sobre dosagem de benzocaína (1,0g/10mL de álcool/15L de água), para retirada de amostras de fragmentos da pele da região lateral direita e do tecido hepático, para análise histológica e histoquímica. A coleta do sangue foi por punção dos vasos caudais.

Amostras de água foram coletadas antes do experimento (basal), logo no início (inicial), após 12 horas da montagem do sistema (12 horas) e a seguir a cada 24 horas (36 e 60 horas), para determinação da concentração de amônia total (reagente de Nessler), concentração de oxigênio dissolvido, pH (peagâmetro YSI 63), e temperatura

(oxímetro digital YSI 55). Para cálculo do NH_3 foi utilizada a fórmula abaixo (Emerson et al., 1975).

$$\text{pK} = 0,09018 + \frac{2729,92}{(273,2 + T)}$$

$$f_{\text{NH}_3} = \frac{1}{(1 + 10^{(\text{pK} - \text{pH})})}$$

pK = constante

T = temperatura em Kelvin

pH = potencial hidrogeniônico

f_{NH_3} = fração de NH_3

Osmolaridade e pH das soluções de *Aloe vera*

A osmolaridade e o pH das soluções de *A. vera* utilizadas foram mensurados (n=4). Para determinação da osmolaridade foi utilizado o aparelho 5500 Vapor Pressure Osmometer e para medição do pH o aparelho HI 9321 Microprocessor pH Meter

Parâmetros hematológicos

Em uma alíquota de sangue total heparinizado foram determinados o hematócrito, número de eritrócitos (NE) e concentração de hemoglobina (Kit Labtest - hemoglobina). Para a determinação do hematócrito, capilares de vidro foram preenchidos com sangue e centrifugados a 3000 rpm por cinco minutos. Os valores foram determinados a partir de um cartão de leitura padronizado de hematócrito e expresso em %.

A contagem de eritrócitos foi determinada utilizando-se 10 μL de sangue em 2mL de solução de citrato formol (isotônica). Dessa mistura, utilizou-se um volume de 10 μL para a contagem em microscópio óptico, em Câmara de Neubauer de acordo com

LIMA et al. (1969). A contagem de eritrócito após a reprodução não foi feita por problemas técnicos.

O cálculo do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram realizados de acordo com LIMA et al. (1969), segundo as seguintes fórmulas:

$$\text{VCM } \mu\text{mm}^3 = \frac{\text{hematócrito (\%)}}{\text{RBC (milhões/mm}^3)} \times 10$$

$$\text{HCM (pg/célula)} = \frac{\text{Hb total (g\%)}}{\text{RBC (milhões/mm}^3)} \times 10$$

$$\text{CHCM (\%)} = \frac{\text{Hb total (g\%)}}{\text{Htc (\%)}} \times 100$$

Parâmetro metabólico

De uma alíquota do sangue, extraiu-se plasma e através de um sistema enzimático e método estático, a glicose oxidase catalisa a reação da glicose formando o peróxido de hidrogênio, que reage com 4-aminoantipirina e fenol, resultando uma intensidade de cor proporcional à concentração de glicose na amostra (Kit Labtest).

Parâmetros do sistema imunológico não específico

Análise da atividade respiratória de leucócitos

Uma alíquota de sangue heparinizado foi utilizada para determinação da atividade respiratória dos leucócitos.

A análise da atividade respiratória de leucócitos seguiu o protocolo de Anderson e Siwicki (1995), modificado por Biller (2008). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio

colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (KLEIN, 1990). A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Femto 600 plus) em comprimento de onda de 540nm.

Análise da atividade respiratória de leucócitos com Aloe vera in vitro

Um exemplar de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foi anestesiado em água com benzocaína (0,1 g L⁻¹), para coleta de sangue por punção de vasos caudais. O sangue foi coletado com seringa e utilizou-se o anticoagulante heparina. Foi usado 5 repetições para cada tratamento, sendo o tratamento controle o tampão PBS, e a seguir usado 0,01%, 0,02%, 0,05% e 0,1% de *Aloe vera*. Para a diluição dos tratamentos foi utilizado o mesmo tampão PBS. Foi colocado 100µL de sangue total em microtubos e acrescidos mais 100 µL dos tratamentos e incubados durante uma hora. Para cada tratamento utilizado foi feita uma amostra como branco sendo utilizado a água destilada ao invés do sangue e a seguir feito os mesmos procedimentos. Essa medida foi tomada para isolar qualquer leitura no espectrofotômetro que não fosse da atividade respiratória de leucócitos.

Após o período de incubação foi retirado 100 µL de cada amostra e utilizado a análise da atividade respiratória de leucócitos segundo o protocolo de Anderson e Siwicki (1995), modificado por Biller (2008). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (KLEIN, 1990). A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Metrolab 1700) em comprimento de onda de 540nm.

Análise da concentração e atividade de lisozima sérica

Uma alíquota de sangue sem anticoagulante foi deixado em repouso por duas horas em temperatura ambiente e centrifugado a 3000rpm por cinco minutos, a 10°C, para extração de soro que foi armazenado a -20°C até determinação da concentração da lisozima.

A concentração de lisozima sérica foi determinada com base no método de Smolelis e Hartsell (1949), no qual uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* é usada como substrato para a lise, que é medida pela redução da densidade óptica por meio de espectrofotometria. A análise foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) por ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) e adaptado por Marzocchi-Machado et al. (1999) e Abreu et al. (2009). A curva padrão foi estabelecida com seis concentrações de lisozima (50, 80, 100, 150, 200 e 300 ng em 300 µL de tampão fosfato de sódio – NaH₂PO₄; 0,05 M; pH 7,4). Um volume de 300 µL de cada concentração foi pipetado em uma cubeta de 1 mL seguido da adição de 300 µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (10 mg de bactéria em 50mL de tampão fosfato de sódio). A densidade óptica foi medida imediatamente por espectrofotometria cinética, durante 10 minutos, com leituras realizadas a cada 20 segundos em comprimento de onda de 450 nm. A diferença entre a densidade óptica inicial e final (ΔDO) de cada concentração foi calculada em 5 minutos de leitura e a curva representada graficamente (Figura 10).

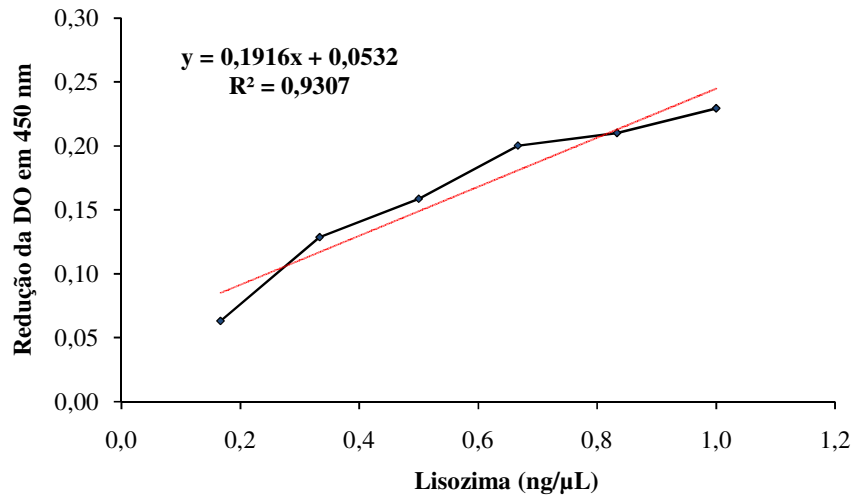


Figura 10. Curva padrão de lisozima. Os pontos representam os valores de ΔDO para cada concentração de lisozima testada.

As amostras de soro mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram submetidas a tratamento térmico de $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, para inativação das proteínas do sistema complemento e garantia de que a lise foi provocada pela lisozima. O mesmo procedimento que determinou a curva padrão foi realizado com as amostras, utilizando-se volumes de $150\text{ }\mu\text{L}$ de soro e $150\text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato de sódio.

A concentração da lisozima de cada amostra foi quantificada pela curva padrão determinada, utilizando-se a equação da reta e as respectivas ΔDO s (WON et al., 2004).

Parâmetros histológicos

Microscopia de luz

Amostras de pele da região lateral direita e de fígado foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% por 24 horas, desidratadas em série alcoólica crescente, diafanizadas em série de xilóis, incluídas em histosec, microtomia de $5\mu\text{m}$ e coloração

por hematoxilina de Harris - eosina (HE). Os cortes foram analisados e fotodocumentados em fotomicroscópio Leica DM 2500.

Histoquímica

Os cortes de pele foram submetidos a técnica histoquímica para identificação de mucinas neutras, utilizando-se o reativo ácido periódico de Schiff (PAS). Os cortes foram tratados com ácido periódico a 1% por 5 minutos, lavados e posteriormente corados com reativo de Schiff por 15 min. Em seguida passaram por banho em água sulfurosa, desidratação em série alcoólica crescente, diafanização e montagem em lâminas de vidro.

Morfometria de hepatócitos

Medidas das áreas de citoplasma e núcleo dos hepatócitos foram obtidas por meio do programa Leica QWin V3. Foram feitas 60 medições do núcleo e do citoplasma dos hepatócitos de cada peixe.

Contagem das células de muco

Foi feita a contagem de todas as células de muco quando observadas, distribuídas em 6 cortes por peixe em fotomicroscópio Leica DM 2500.

Análise estatística

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) e os resultados tratados por análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas por teste de Duncan (5%) no programa estatístico SAS 9.2.

RESULTADOS

Os valores médios de pH $7,03 \pm 0,33$; temperatura $25,85 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ e oxigênio dissolvido $6,21 \pm 0,91\text{mg/L}$ da água das caixas experimentais se manteve dentro dos

padrões recomendados para a espécie (GOMES e URBINATI, 2005). O nível médio inicial da amônia não-ionizada foi de 0,004 mg/L. No tratamento controle notou-se uma maior excreção da amônia, chegando a valores de 0,05 mg/L, no tempo de 36 horas. Após o sistema de renovação de água ser ligado os níveis de amônia retonaram aos valores próximos do basal, em torno de 0,003 mg/L (Figura 11).

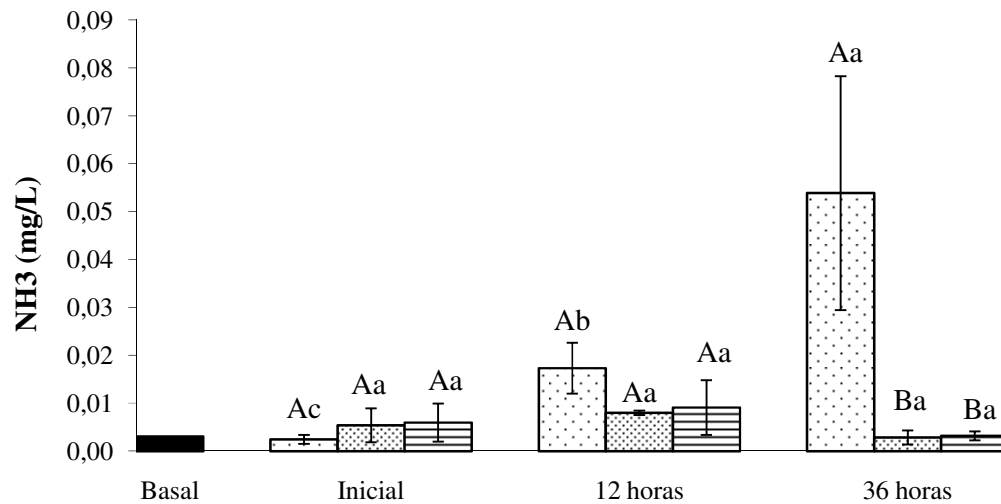


Figura 11. Concentração de NH_3 na água nos tratamento com *Aloe vera* após a reprodução. Basal - antes do experimento, Inicial – logo após soltura dos peixes nas caixas, 12 e 36 horas–tempo percorrido depois da montagem do experimento. Basal (■), C (□), T1 (▨) e T2 (▤). Letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo tempo e minúsculas entre os tempos no mesmo tratamento.

Na Figura 12 observa-se que a osmolaridade aumentou significativamente com o aumento da concentração de *Aloe vera*, enquanto o pH mostrou perfil oposto ao da osmolaridade, diminuindo conforme aumentou a concentração de *Aloe vera*.

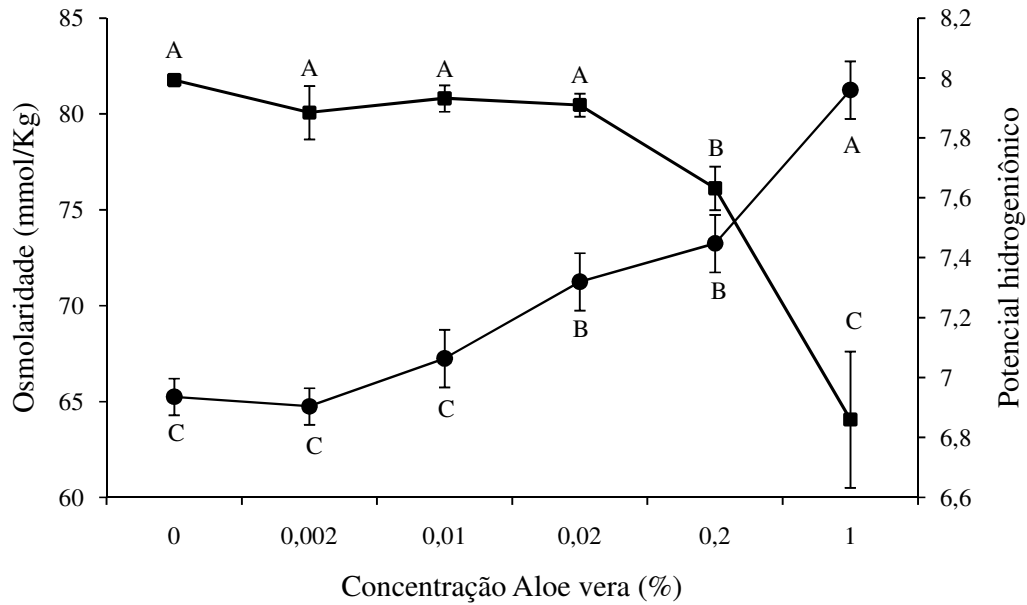


Figura 12. Osmolaridade (●) e potencial hidrogeniônico (■) das concentrações de *Aloe vera*. Letras indicam diferença entre as concentrações e barras verticais representam desvio padrão da média.

Todas as fêmeas desovaram. A glicemia apresentou um valor de pico logo após o manejo da reprodução, voltando a valores próximos do basal no controle e tratamento 2. O tratamento 1 não diferiu do controle e do tratamento 2 embora tenha apresentado um valor de glicemia maior, porém diferiu da testemunha (Figura 13).

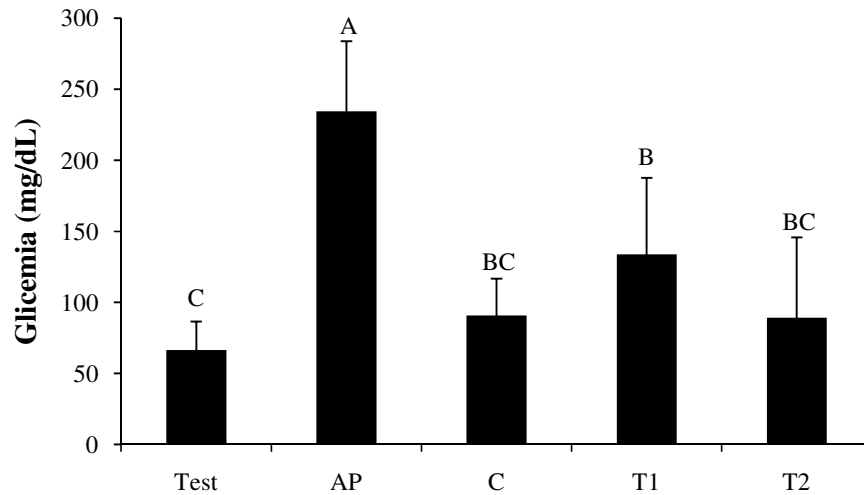


Figura 13. Glicemia de matrinxã antes (Test), após reprodução (AP) e tratamentos com *Aloe vera* (C, T1 e T2). Letras indicam diferença entre os tratamentos e barras verticais representam desvio padrão da média.

De acordo com a Figura 14, o hematócrito não apresentou diferença entre os tratamentos (Figura 14), juntamente com o volume corpuscular médio (VCM) (Figura 14) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). O número de eritrócito foi maior na testemunha diferindo de todos os tratamentos, e não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 14). Já a hemoglobina corpuscular média (HCM) apresentou valores inversos, sendo a testemunha o menor valor diferindo de todos os tratamentos, e os tratamentos também não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 14). A concentração de hemoglobina aumentou após o manejo da reprodução, diferindo dos tratamentos 1 e 2. As menores médias foram dos tratamentos 1 e 2 respectivamente. O controle e a testemunha não diferiram de nenhum tratamento (Figura 14).

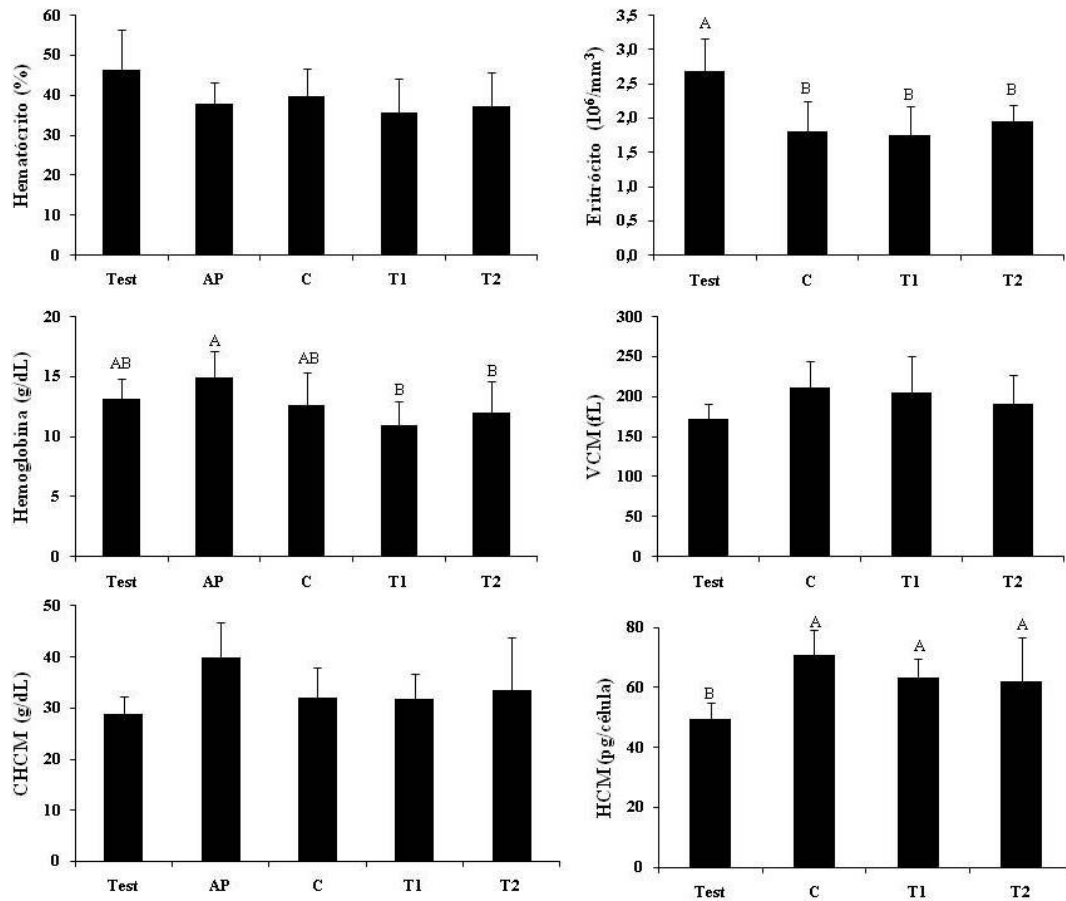


Figura 14. Hematócrito, número de eritrócito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de matrinxã antes (Test), após reprodução (AP) e tratamentos com *Aloe vera* (C, T1 e T2). Barras verticais representam desvio padrão da média. Letras indicam diferença entre os tratamentos e barras verticais representam desvio padrão da média

De acordo com a Figura 15, houve uma queda significativa na atividade respiratória de leucócitos nos peixes amostrados após o manejo da reprodução, bem como no grupo controle. Os peixes dos tratamentos com *A. vera* apresentaram médias significativamente maiores que o controle, mas inferiores aos peixes testemunhas. A

maior atividade respiratória foi registrada nos peixes testemunhas, diferente de todos os tratamentos.

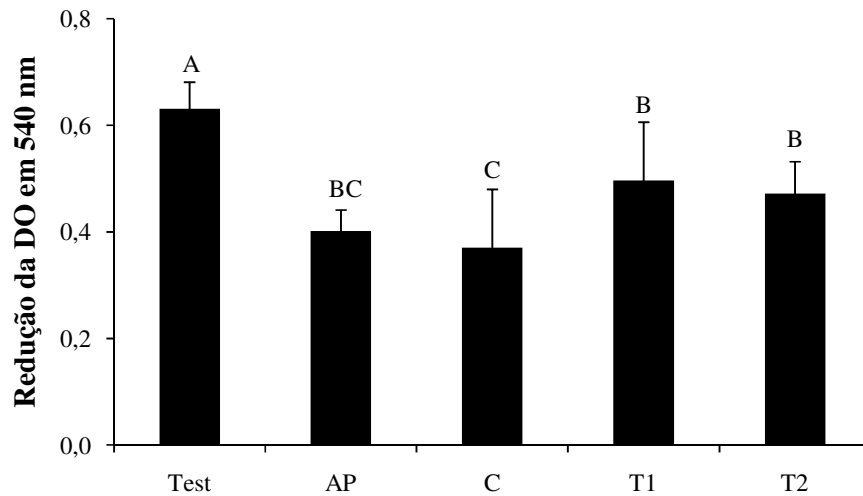


Figura 15. Atividade respiratória de leucócitos de matrinxã antes (Test), após reprodução (AP) e tratamentos com *Aloe vera* (C, T1 e T2). Letras indicam diferença entre os tratamentos e barras verticais representam desvio padrão da média.

Todos os tratamentos demonstraram aumento da atividade respiratória de leucócitos testada *in vitro* com *Aloe vera*, em relação ao controle, porém somente o mais concentrado não diferiu significativamente. A maior atividade ocorreu com 0,02%, sendo significativamente maior que todas. As concentrações de 0,01% e 0,05% tiveram valores intermediários sendo maiores que o controle, mas menor que a concentração de 0,02% (Figura 16).

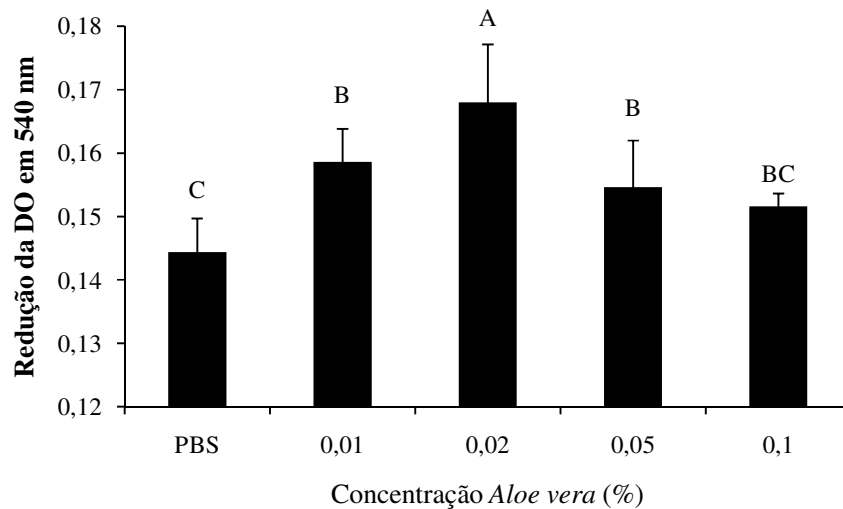


Figura 16. Atividade respiratória de leucócitos com tratamentos de 0,01%, 0,02%, 0,05% e 0,1% de *Aloe vera in vitro*, controle (PBS). Letras indicam diferença entre os tratamentos e barras verticais representam desvio padrão da média.

Com relação à concentração da lisozima no soro (Figura 17) não se observou diferença entre os tratamentos, embora os valores sejam mais reduzidos nos peixes amostrados logo após o manejo da desova.

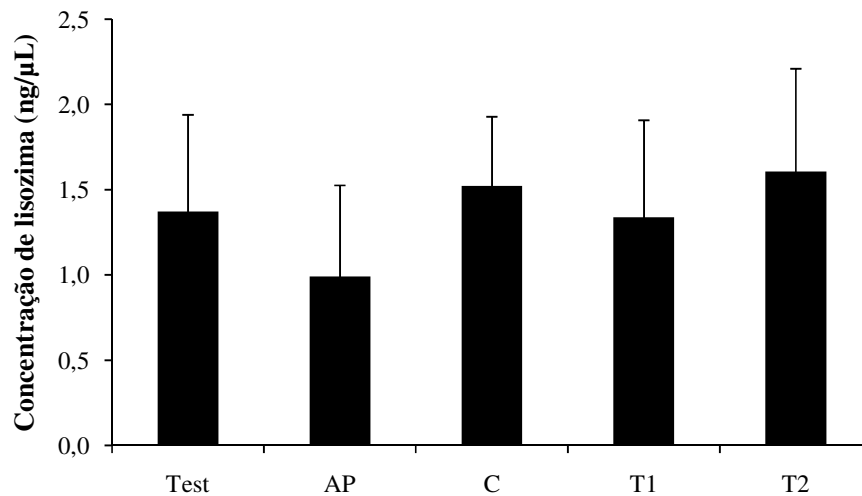


Figura 17. Concentração de lisozima em soro de matrinxã antes (Test), após reprodução (AP) e tratamentos com *Aloe vera* (C, T1 e T2). Barras verticais representam desvio padrão da média.

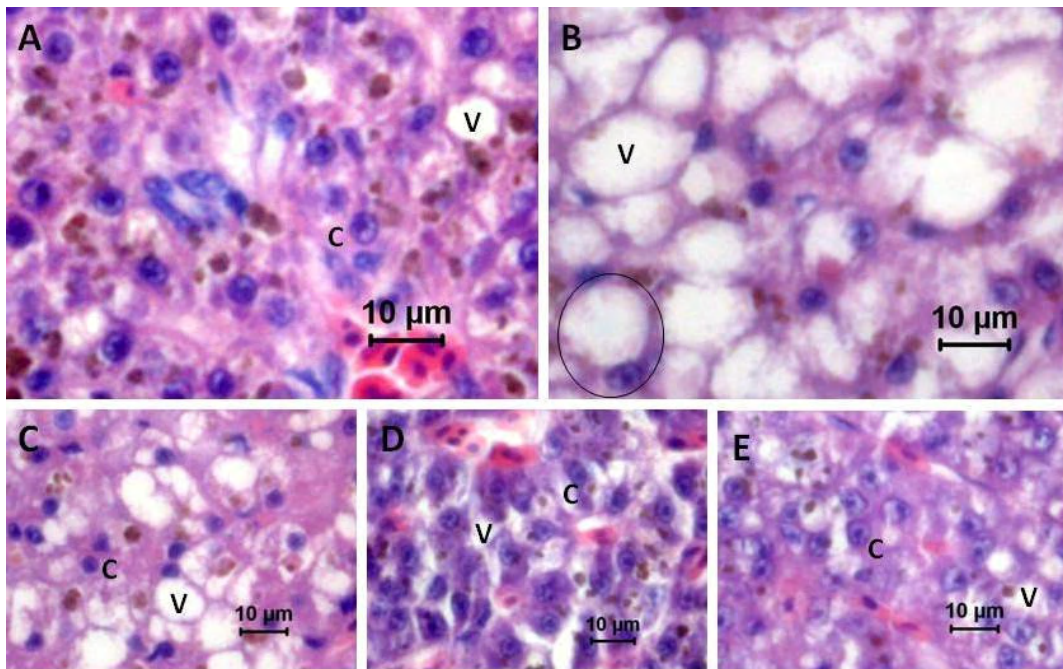


Figura 18. Fotomicrografia de cortes transversais de fígado de matrinxãs antes, após reprodução e tratamentos com *Aloe vera*. Basal - (A), após reprodução - (B), controle coleta final - (C), tratamento 1 coleta final - (D), e tratamento 2 coleta final - (E). Citoplasma (c), vacúolo (v), e hepatócito vacuolizado (o).

No fígado dos peixes testemunhas, o órgão se apresentou com hepatócitos normais, porém após o manejo da reprodução observou-se um acúmulo de gordura evidenciado por hepatócitos vacuolizados, o que também foi demonstrando pela relação da área entre o núcleo e o citoplasma, na Figura 19. Na coleta final, após 72 horas da reprodução observou-se recuperação parcial das células do fígado, em relação aos vacuolos e área do citoplasma (Figura 18).

A análise morfométrica mostrou que a área do núcleo dos hepatócitos aumentou após a reprodução, porém não se verificou diferença entre os tratamentos (Figura 19).

A área do citoplasma dos hepatócitos era maior após o manejo da reprodução, diferindo de todas as outras coletas. O tratamento 1 apresentou o menor valor, diferente do controle e da testemunha, enquanto a testemunha e tratamento 2 tiveram valores intermediários. (Figura 19).

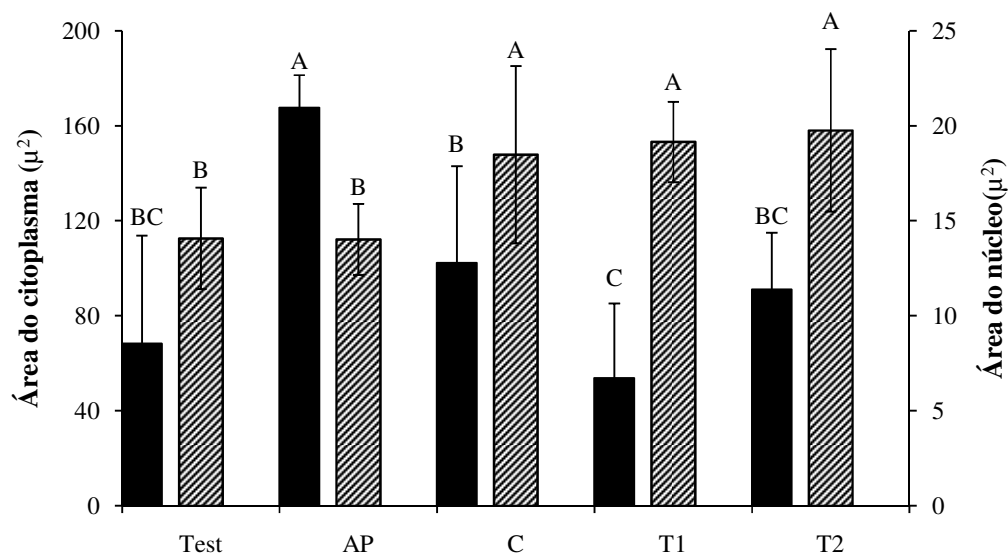


Figura 19. Área do citoplasma (■) e do núcleo (▨) de hepatócitos de matrinxã antes (Test), após reprodução (AP) e tratamentos com *Aloe vera* (C, T1 e T2). Letras indicam diferença entre os tratamentos e barras verticais representam desvio padrão da média.

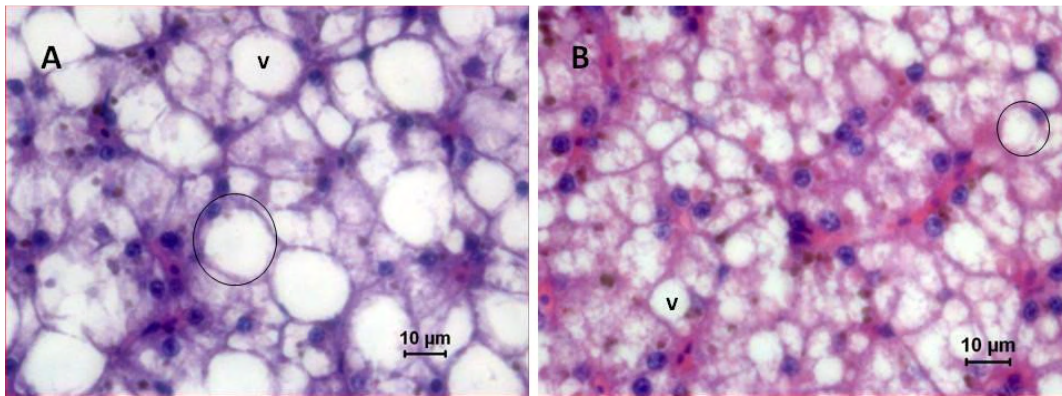


Figura 20. Fotomicrografia de cortes transversais de fígado de matrinxãs após reprodução. Fêmea - (A), Macho - (B). Vacúolo (v) e hepatócito vacuolizado (○).

Após a reprodução observa-se que as fêmeas tiveram um hepatócito mais vacuolizado em relação ao macho (Figura 20).

Na análise histológica, nota-se que na pele da testemunha (Figura 21 - A) estão presentes todas as camadas e estruturas, como membrana basal, célula de muco, epiderme e melanóforo. Após a reprodução (Figura 21 - B), observou-se perda da camada epitelial, juntamente com as células de muco e a membrana basal. O estroma também é visível somente nesse momento.

Entre 24 e 48 horas após a reprodução observou-se no tratamento 2 uma recuperação da pele, pois já foi possível encontrar algumas células de muco, o que também se verificou no controle entre 48 e 72 horas após a reprodução. Após 72 horas da reprodução na coleta final, a estrutura da pele estava completa em todos os tratamentos, apresentando inclusive as células de muco (Figura 21).

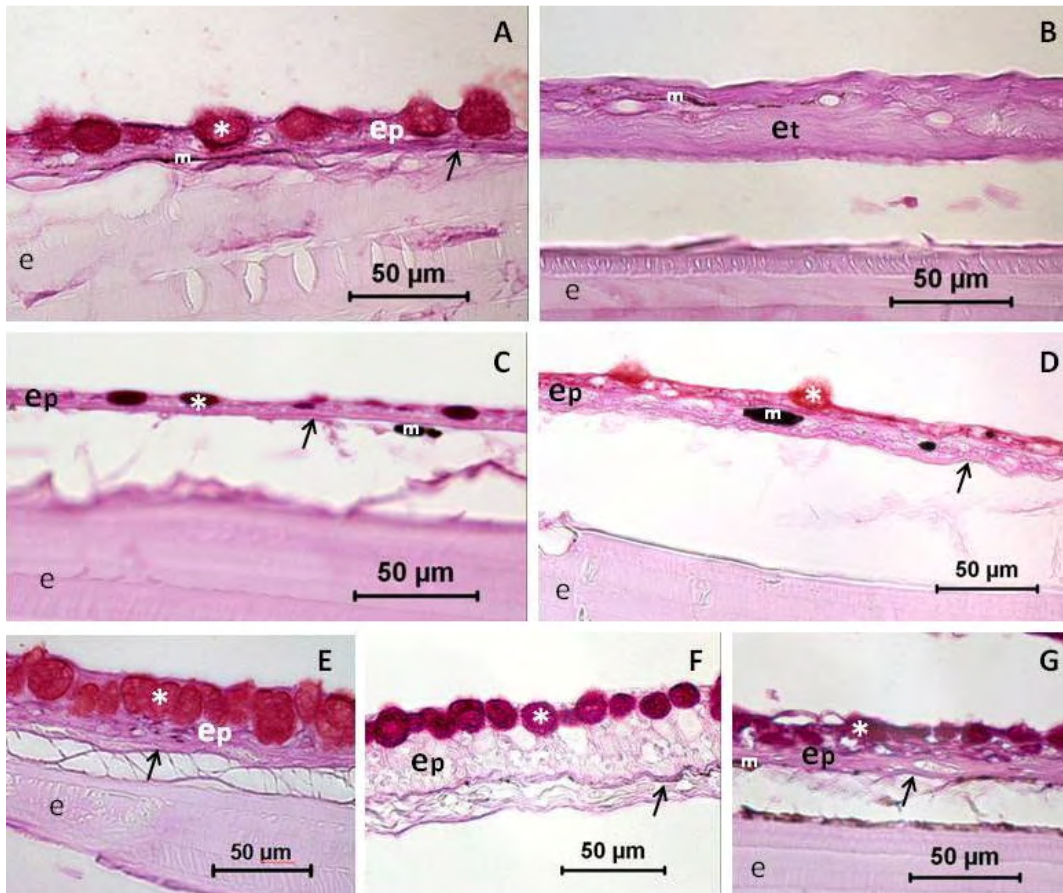


Figura 21. Fotomicrografia de cortes transversais de pele de matrinxãs antes, após reprodução e tratamentos com *Aloe vera*. Basal (A), após reprodução (B), tratamento 2 entre 24 e 48 horas após reprodução (C), controle entre 48 e 72 horas após reprodução (D), controle coleta final (E), tratamento 1 coleta final (F), e tratamento 2 coleta final (G). Escama (e), epiderme (ep), melanóforo (m), estroma (et), célula de muco (*), e membrana basal (↑).

Os peixes que morreram, independentemente dos tratamentos, quase não tinham ou mesmo não apresentavam células de muco na região do corpo onde foram coletadas as amostras de tecido, sendo observadas em maior número somente na coleta final após 72 horas da reprodução, quando os peixes restantes foram os sobreviventes e aparentemente apresentavam as melhores condições. Os peixes do tratamento 1

mostraram a maior quantidade de células de muco e o menor número de peixes mortos ao longo do experimento (Figura 22).

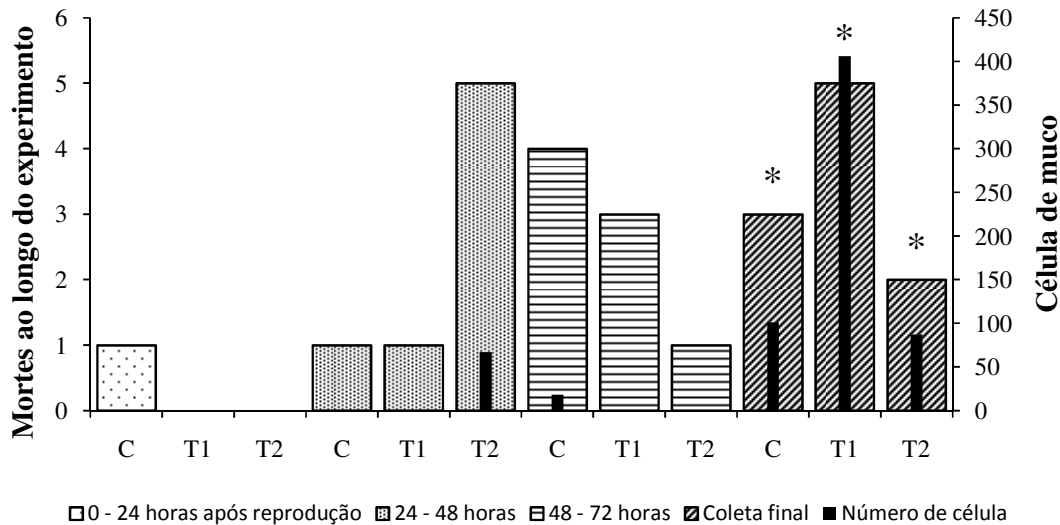


Figura 22. Número de células de muco relacionado com o tempo de mortes de matrinxã após a reprodução em tratamentos com *Aloe vera*. A coleta final representa os peixes sobreviventes (*).

DISCUSSÃO

A qualidade da água é um fator muito importante pois influencia no estado fisiológico do peixe. A presença de inúmeras substâncias na composição da *Aloe vera* (CHOI e CHUNG, 2003) promoveu a alteração na osmolaridade da água, resultando em uma alteração na excreção de amônia nos diferentes tratamentos. A diminuição do pH também diminuiu a fração da amônia não-ionizada na água, fazendo com que isso colabore, também para uma menor concentração da amônia não-ionizada na água encontrada nos tratamentos. Resultado semelhante foi encontrado no experimento de transporte com *Aloe vera*, apresentado no capítulo 2 desta dissertação, no qual os peixes do grupo controle apresentaram maior excreção de amônia, indicando efeito semelhante

ao observado quando se adicionou sal na água de transporte da mesma espécie (CARNEIRO e URBINATI, 2001).

Os peixes após a reprodução apresentaram hiperglicemia, com valores em torno de 250 mg/dL de glicose no sangue. Isso é decorrente da liberação aumentada de catecolaminas e cortisol, que induzem incremento da gliconeogênese hepática (MOMMSEN et al., 1999). A hiperglicemia indica o quanto o manejo da reprodução induzida foi estressante para os peixes, sendo uma das causas da alta mortalidade encontrada após o manejo (MILLS, 1971; SCHRECK et al., 2001). A diminuição dos níveis de glicose, nos peixes após a reprodução pode ser explicada pela ausência do agente estressor, e pela falta de apetite do peixe devido ao estresse decorrido na reprodução.

Nos peixes estressados, a hiperglicemia precede as alterações hematológicas (TAVARES-DIAS et al., 2001; URBINATI e CARNEIRO, 2001), porém depende da intensidade e tempo do agente estressor. Mudanças no hematócrito, número de eritrócito ou na concentração de hemoglobina, após estímulos estressantes, podem indicar a ocorrência de hemoconcentração ou hemodiluição causadas por disfunção osmorregulatória (HOUSTON et al., 1996). O aumento nestes indicadores hematológicos durante a resposta de estresse indica aumento da capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue para suprir a demanda aumentada dos tecidos (NIKINMAA et al., 1983), por isso observamos a hemoglobina corpuscular média aumentada depois da reprodução.

O número elevado de eritrócito na circulação sugere liberação dessas células pelo baço (PULSFORD et al., 1994), um dos principais sítios eritropoiéticos em teleósteos. Carneiro (2001) demonstrou diferentemente, no transporte de *Brycon cephalus*, que 24 horas após o transporte houve um acréscimo no número de eritrócitos,

mas a avaliação deste parâmetros nos reprodutores do presente estudo ocorreu logo após a exposição dos animais à condição estressante, indicando uma resposta aguda de compensação energética pelo organismo.

Alguns estudos têm investigado a ação de substâncias com atividade estimuladora do sistema imune inato de peixes brasileiros (BELO et al., 2005; ABREU et al., 2006 a, b; AFFONSO, 2006; ABREU et al., 2009; BILLER et al., submetido).

Durante a reprodução, os peixes ficam expostos a um conjunto de estressores, levando o peixe a forçar os mecanismos de ajuste fisiológico, como foi visto em relação a glicemia. Entre as respostas de ajuste ao quadro de estresse, algumas respostas imunológicas são afetadas entre elas as respostas inatas (WEENDELAR BONGA, 1997). No presente estudo, a avaliação da atividade respiratória dos leucócitos mostrou que ocorreu uma severa queda na atividade respiratória de leucócitos dos peixes após o manejo da reprodução, que foi parcialmente revertida nos peixes tratados com *A. vera*, mas não nos peixes do grupo que não foi exposto ao extrato da planta. Este resultado sugere que a *Aloe vera* pode ter interagido com receptores de membranas de neutrófilos, monócitos e macrófagos, estimulando a produção e conseqüente aumento de EROs produzidos por essas células. O aumento na produção de EROs por esses granulócitos é considerado um dos indicadores da ativação do sistema imune não específico em peixes (JENEY e ANDERSON, 1993; JORGENSEN e ROBERTSEN, 1995).

Para provar que esse aumento na atividade respiratória de leucócitos foi devido a ação da *Aloe vera*, um experimento *in vitro* com células do sangue total, de pacu, foi realizado e também observou-se esse efeito *in vitro* nos tratamentos com *Aloe vera*. Resultados semelhantes foram encontrados por Zhang et al. (2006), porém em macrófagos de rato, onde duas hidrocumarinas presentes na *Aloe vera* aumentaram a atividade respiratória dos macrófagos. Sjeraba e Quere (2000) também encontraram

resultados semelhantes quando isolaram o acemanano da *Aloe vera* e testaram em frangos, aumentando a ativação dos macrófagos. Os macrófagos desempenham um papel importante no mecanismo de defesa. Quando ativados, inibem o crescimento de uma ampla variedade de células tumorais e de microorganismos. Macrófagos geram grandes quantidades de EROS, em resposta a uma variedade de estímulos na membrana, por uma sequência coordenada de reações bioquímicas conhecidas como o burst oxidativo (ZHANG et al., 2006).

O aumento da atividade respiratória de leucócitos, juntamente com a concentração de *Aloe vera*, indica que o produto entrou em contato com os leucócitos na circulação. Esse processo pode ter ocorrido pelo mesmo mecanismo em que os anestésicos são absorvidos pelos peixes. Segundo Ross e Ross (2008) a solução é ventilada, pelo peixe e moléculas da droga difundem rapidamente nos espaços de sangue nas lamelas secundárias, que drenam o sangue arterial eferente. Outra forma de absorção é direta pela ingestão das partículas suspensas na solução.

A determinação da concentração de lisozima é um parâmetro importante para a avaliação da imunidade inata nos peixes. Esta proteína tem capacidade de lisar bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de possuir função de opsonização, ativação do sistema complemento e da fagocitose (SHAIRESH e SAHOO, 2008). Diversos autores relatam que os imunoestimulantes aumentam a concentração e atividade de lisozima devido ao aumento no número de leucócitos que secretam esta enzima ou ainda pelo aumento de lisozima secretada por cada célula (ENGSTAD et al., 1992; KUMARI e SAHOO, 2006). Em situação de estresse, ocorre alteração nas células brancas e linfopenia (WENDEELAR BONGA, 1997; MARTINS et al., 2000).

No presente estudo, não se quantificou o número de células brancas, mas a concentração de lisozima foi numericamente menor após a reprodução, que poderia ser

explicada por uma redução do número de leucócitos já que a lisozima se encontra em maior quantidade em neutrófilos, monócitos e em macrófagos (MURRAY e FLETCHER, 1976; LIE et al., 1989). Essa resposta seguiu o mesmo perfil observado na produção de EROs. Apesar do teste estatístico não apontar diferença significativa, a resposta biológica demonstra diferença na resposta dos peixes antes e depois da reprodução.

A manipulação dos peixes para extrusão de ovócitos e espermição por pressão abdominal é um processo bastante abrasivo e naturalmente desgasta a camada epitelial da pele do peixe juntamente com as células de muco, como pode ser observado nos reprodutores de matrinxã, de acordo com as Figuras 21 e 22.

Os peixes que recuperaram a camada da epiderme mais rapidamente tiveram menor mortalidade, como observado na Figura 22, salientando a importância de se evitar a perda das camadas de cobertura da pele durante o manejo da reprodução, principalmente na extrusão das fêmeas e espermição dos machos. A ausência dessa camada, somado ao quadro de imunossupressão causado pelo cortisol (WENDELAAR BONGA, 1997), facilita a entrada de patógenos, sendo isso um fator importante envolvido na mortalidade dos peixes após a reprodução.

No grupo testemunha (Figura 21 - A) estão presentes todas as camadas e estruturas, segundo Whitear (1986), porém após a reprodução (Figura 21 - B) houve perda da camada epitelial, sendo o estroma visível somente nesse momento devido ao manejo da extrusão e espermição causar a retirada total da epiderme.

A participação do fígado foi avaliada por morfometria e histologia dos hepatócitos. A figura 19 mostra que a área do citoplasma do hepatócito aumentou devido a um acúmulo de gordura, nos peixes amostrados após o manejo da reprodução. Essa gordura hepática pode ser proveniente de gordura visceral depositada como reserva

de energia para a reprodução, pois em ambiente natural os peixes reofílicos tropicais ao longo da migração usam essa gordura visceral como energia, porém em sistema de criação essa perda de gordura visceral não ocorre com a mesma intensidade. Observa-se que nas fêmeas o estoque é maior (Figura 20), devido a quantidade de gordura correspondente ao vitelo, pois segundo Speare (2000), as fêmeas quando não desovam reabsorvem os oócitos e redistribuem o lipídeo do saco vitelínico no fígado, sendo comum encontrar excesso de gordura no fígado após a reprodução de fêmeas que ou não desovaram ou tiveram sobra de oócitos. Como na extrusão é praticamente impossível retirar todos os oócitos, esse acúmulo de gordura é provocado também pelos oócitos que restaram.

Na coleta final, observou-se uma redução dos vacúolos indicando recuperação do órgão. Também é necessário salientar os efeitos dos hormônios na reprodução induzida, pois injeta-se uma grande quantidade de diferentes hormônios, sem informações e estudos sobre o efeito destes no metabolismo energético do peixe.

Os lipídeos, além de comporem as membranas biológicas, são importantes nos processos fisiológicos, por serem utilizados na síntese de hormônios (SHERIDAN, 1994), além da função importante como compostos orgânicos de armazenamento de energia (HOAR et al., 1979). Essa função faz com que os lipídeos tenham um papel fundamental no metabolismo e manutenção do equilíbrio da homeostase (SHERIDAN, 1994), sendo caro ecologicamente perder essa reserva (ARTS et al., 2009). Isso poderia explicar porque as fêmeas procuram reabsorver os lipídeos do saco vitelínico.

A área do núcleo aumentada nos peixes após a reprodução, tanto naqueles tratados com *A. vera* como nos controles, indica uma maior atividade dos hepatócitos, que pode estar ligada ao processo de metabolização dos hormônios, e da reabsorção de lipídeos. A análise histológica confirma essas alterações.

Os resultados encontrados neste estudo demonstram o quanto é estressante o manejo da reprodução levando o peixe ao extremo da sua capacidade fisiológica, e também indicam que a adição de *Aloe vera* na água não alterou a resposta metabólica de estresse investigada, mas potencializou a resposta imunológica não específica melhorando as condições fisiológicas dos peixes após a reprodução induzida. Contudo mais pesquisas deverão ser feitas com espécies nativas no sentido de diminuir os efeitos do estresse na reprodução e melhorar as respostas imunológicas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J.S.; ROVIERO, D.P.; URBINATI, E.C. Efeito do β -1,3 glicano, administrado intraperitonealmente e pela dieta, no perfil hematológico de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Anais do Congresso Aquaciência 2006. Bento Gonçalves - RS, 2006a.
- ABREU, J.S.; ROVIERO, D.P.; URBINATI, E.C. Prevenção do estresse de captura em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com beta 1,3 glicano. Anais do Congresso Aquaciência 2006. Bento Gonçalves - RS, 2006b.
- 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*). Brazilian Journal of Biology, v.69, n.4, p.31-47, 2009.
- AFFONSO, S.F. Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (editores) Diseases

in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p.185-202, 1995.

ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; NARAHARA, M.Y.; FENERICH VERANI, N. Reprodução induzida da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), mantida em cativeiro. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 31, n.2, p.803-811, 2002.

ARTS, M.T.; BRETT, M.T.; KAINZ, M.J. Lipids in Aquatic Ecosystems, Springer, New York, 395p, 2009.

BATLOUNI, S.R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M.I. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium An approach addressed to aquaculture. Animal Reproduction Science v.96, p.116–132, 2006.

BELO, M.A.A.; SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R.; SOARES, V.E.; OTOBONI, A.M.M.B.; MORAES, J.E.R. 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, p. 146- 154, 2005.

BERNARDINO, G.; SENHORINI, J.A.; FONTES, N.A.; BOCK, C.L.; MENDONÇA, J.O.J. Propagação artificial do matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869), (Teleostei, Characidae). Boletim Técnico do CEPTA v.6, p.1-10, 1993.

BILLER, J.D. Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila*, em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β-glucano. 2008. 106p. Dissertação (Mestre em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

BILLER, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; URBINATI, E.C. Dietary beta-glucan enhances survival and some immune parameters of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, (submetido).

- CARNEIRO, P.C.F. Estresse provocado pelo transporte e repostas fisiológicas do matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae). Tese (Doutorado em Aquicultura). Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 137p, 2001.
- CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research* 32, 297-304, 2001.
- CHOI, S.; CHUNG, M.H. A review on the relation between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*, v.1, n.1, p. 53-62, 2003.
- CHOI, S.; SON, B.W.; SON, Y.S. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from *Aloe vera*. *British Journal of Dermatology*, 2001.
- CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Ed: TecArt, 533p, 2004.
- DAVIS, R.H.; DONATO, J.J.; HARTMAN, G.M. Anti-inflammatory and wound healing activity of a growth substance in *Aloe vera*. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, p.77-81, 2001.
- ELLIS, A.E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J.S., FLETCHER, T.C., ANDERSON, D.P., ROBERSON, B.S., MUISWINKEL, W.B. (editores). *Techniques in Fish Immunology*. USA: SOS publications, p.101-103, 1990.
- EMERSON, K. ; RUSSO, R.C. ; LUND, R.E. ; THURSTON, R.V. Aqueous ammonia equilibrium calculations : effects of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, v.32, p.2379-2383, 1975.
- ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish and Shellfish Immunology*, v.2, p.287–297, 1992.

FAST, M.D.; SIMS, D.E.; BURKA, J.F.; MUSTAFA, A.; ROSS, N.W. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, p.645–657, 2002.

GOMES, L.C.; URBINATI, E.C. Criação de matrinxã. In: BALDISSEROTTO, B; GOMES, L.C. (Org.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria v. 1, p.149-174, 2005.

HARVEY, B.; CAROSFELD, J. *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: IDRC, 145p, 1993.

HIBIYA, T. *An atlas of fish histology. Normal and pathological features*. *Aquaculture*, v. 37, 3 ed, p. 287, 1984.

HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; BRETT, J.R.; *Fish Physiology, Bioenergetics and Growth*, Editora Academic Press, New York, v.8, 785p, 1979.

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

IGER, Y.; WENDELAAR-BONGA, S.E. Cellular responses of the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to acidified water. *Cell and Tissue Research* v.275, p.481-492, 1994.

IGER, Y.; LOCK, R.A.C.; VAN DER MEIJ, J.C.A.; WENDELAAR-BONGA, S.E. Effects of water-borne cadmium on the skin of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* v.26, p.342-350, 1994a.

IGER, Y.; ABRAHAM, M.; WENDELAAR-BONGA, S.E. Response of club cells in the skin of the carp *Cyprinus carpio* to exogenous stressors. *Cell and Tissue Research* v.277, p.485-491, 1994b.

- IM, S.A.; OH, S.T.; SONG, S.; KIM, M.R.; KIM, D.S.; WOO, S.S.; JO, T.H.; PARK, Y.I.; LEE, C.K. Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *International Immunopharmacology*, v. 5, p. 271-279. 2005.
- JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v.116, p.315-319, 1993.
- JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Yeast C-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, v.19, p.43-57, 1995.
- KIM, K.H.; HWANG, Y.J.; BAI, S.C. Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish *Sebastes schlegelii* fed diets containing different doses of aloe. *Aquaculture*, v.180, p. 13–21, 1999.
- KLEIN, J. *Immunology*. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc., p.311-334, 1990.
- KUMARI, J.; SAHOO, P.K. Dietary β -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, v.29, p.95-101, 2006.
- LEATHERLAND, J.F.; WOO, P.T.K. *Fish diseases and disorders*, v.2, p.396, 1998.
- LEONARDO, A.F.G.; ROMAGOSA, E.; BATLOUNI, S.R.; BORELLA, M.I. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). *Aquaculture*, v. 240, p. 451-461, 2004.
- LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; FROYSDAL, E. Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.6, p.1-5, 1989.

- LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO J.B.; GALIZZI, J. e CANÇADO, J.R. Métodos de laboratório aplicados à clínica. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 653p, 1969.
- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.B. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). Acta Scientiarum v.22, p.545-552, 2000.
- MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; POLIZALLO 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. Immunological Investigations, v.28, p.89-101, 1999.
- MILLS, D. Salmon and Trout: A Resource, its Ecology, Conservation and Management. Oliver and Boyd, Edinburgh, 1971.
- MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanism of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries, v.9, p. 211-268, 1999.
- MURRAY, C.K.; FLETCHER, T.C. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. Journal of Fish Biology, v.9, p.329-334, 1976.
- MYLONAS, C.C.; FOSTIER, A.; ZANUV, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 2009.doi:10.1016/j.ygcen.2009.03.007
- NARAHARA, M.Y.; KAVAMOTO, E.T.; GODINHO, H.M. Pesquisas sobre a criação de espécies do gênero *Brycon*, no Instituto de Pesca. In: Seminário sobre a criação de espécies do gênero *Brycon*, 1., 1994, Pirassununga, SP. Anais... Pirassununga: 1994.

NARAHARA, M.Y.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; GODINHO, H.M. Reprodução induzida da pirapitinga do sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 31, n. 3, p. 1070-1075, 2002.

NIKINMAA, M.; SOIVIO, A.; NAKARI, T.; LINDGREN, S. Handling stress in brown trout (*salmo trutta*): physiological response to transport in fresh water or salt water, and recovery in natural brackish water. Aquaculture, v.34, p. 93-99, 1983.

PATENT STORM. <http://www.patentstorm.us/patents/4500510/claims.html>. Damaged fish tissue treating method and composition containing Aloe vera extract. Acessado em 24 de outubro de 2009.

PICKERING, A.D. Changes in the blood cell composition of the brown trout, *Salmo trutta* L. during the spawning season. Journal of Fish Biology, v. 29, p.335–347,1986.

PICKERING, A.D.; CHRISTIE, P. Sexual differences in the incidence and severity of ectoparasite infestation of the brown trout, *Salmo trutta* L. Journal of Fish Biology, v.16, p.669–683, 1980.

PULSFORD, A.L.; LEMAIRE-GONY, S.; TOMLINSON, M.; COLLINGWOOD, N.; GLYNN, P.J. Effects os acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*. Comparative Biochemistry and Physiology, p.129-139, 1994.

SCHRECK, C.B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. General and Comparative Endocrinology, 2009. doi:10.1016/j.ygcen.2009.07.004

SCHRECK, C.B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M.S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. Aquaculture, v.197, p.3–24, 2001.

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

- SHERIDAN, M.A. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. v.107b, n.4, p.495-508, 1994.
- SJERABA, A.; QUERE, P. In vivo macrophage activation in chickens with Acemannan, a complex carbohydrate extracted from Aloe vera. Journal of Immunopharmacology, v.22, p.365, 2000.
- SMOLELIS, A.N.; HARTSELL, S.E. The determination of lysozyme. Journal of Bacteriology, v.58, p.731-736, 1949.
- SOUZA, M.L.R.; DOURADO, D.M.; MACHADO, S.D.; BUCCINI, D.F.; JARDIM, M.I.A.; MATIAS, R.; CORREIA, C.; FERREIRA, I.C. Análise da Pele de Três Espécies de Peixes: Histologia, Morfometria e Testes de Resistência. R. Bras. Zootec., v.32, n.6, p.1551-1559, 2003.
- SPEARE, D. Liver Diseases of Tropical Fish. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, v. 9, n. 3, p. 174-178, 2000.
- SU, Y.T.; CHANG, H.L.; SHYUE, S.K.; HSU, S.L. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. Pharmacology Biochemistry, v.70, p.229, 2005.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES,F.R.; CARNEIRO, P.C.F. Physiological response of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. Boletim do Instituto de Pesca, v.27, p.43-48, 2001.
- URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (editores). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Ed: TecArt, 533p, 2004.
- WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. Physiological Reviews v.77(3), p.591-625, 1997.

WHITEAR, M. The skin of fishes including cyclostomes. In: BEREITER-HAHN, J.; MATOLTSY, A.G; RICHARDS, K.S. (editors). "Biology of the tegument. v. 2 Vertebrates", p.8-64, 1986.

WON, K.M.; KIM S.M.; PARK, S.I. The effects of β -1, 3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. *Journal of Fish Pathology*, v.17, p.29-38, 2004.

YAGI, A.; KABASH, A.; OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; MOUSTAFA, S.M.; KHALIFA, T.I. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. *Planta Medicinal*, v.68, p.957-960, 2002.

ZHANG, X-f.; WANG H-m.; SONG, Y-f.; NIE, L-h; WANG, L-f.; SHEN P-p.; LIU, Y. Isolation, structure elucidation, antioxidative and immunomodulatory properties of two novel dihydrocoumarins from *Aloe vera*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, p.949-953, 2006. doi:10.1016/j.bmcl.2005.10.096

ZACCONE, G.; FASULO, S.; LO CASCIO, P.; AINIS, L.; RICCA, M.B.; LICATA, A. (1989). Effects of chronic exposure to endosulfan on complex carbohydrates and enzyme activities in gill and epidermal tissues of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Archives de Biologie*, v.11, p.171-185, 1989.

ZACCONE, G.; KAPOOR, B.G.; FASULO, S.; AINIS, L. Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes. *Advances in Marine Biology*, v.40, p. 253-276, 2001.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (editores). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Ed: TecArt, 533p, 2004.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.3, p.367-373, 2007.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

IMPLICAÇÕES

Com os recursos pesqueiros cada vez mais escassos, o aprimoramento das técnicas de manejo se tornam necessárias para otimizar o crescimento e incremento da produção de organismos aquáticos. Nesse contexto, as espécies nativas se destacam por apresentar boas condições de cultivo, porém não se tem informações necessárias sobre todas as etapas de criação para formar uma cadeia produtiva sólida e consistente, quando comparado com países desenvolvidos.

Na tentativa de minimizar as perdas causadas pelo estresse e melhorar a produção muitos imunoestimulantes estão sendo testados, mas a viabilidade econômica precisa ser considerada, já que estamos em um país em desenvolvimento e o preço da carne de peixe se torna um entrave para a produção. Portanto um melhor entendimento do sistema imunológico se faz fundamental, juntamente com o desenvolvimento e padronização das técnicas para avaliar o sistema imunológico dos peixes nativos, ferramentas importantes para uma futura e desenvolvida produção de peixes.

Diante do encontrado neste trabalho, verificamos que outros estudos com a mesma abordagem metodológica usando a *Aloe vera* se fazem necessários para um melhor entendimento dos resultados obtidos nesse estudo, porém o uso da *Aloe vera* na ração em um período anterior do transporte ou da reprodução pode ser uma outra alternativa para o uso da babosa na piscicultura.