

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

Avaliação do crescimento e da atividade imune de tilápias alimentadas com dietas suplementadas com unha de gato (*Uncaria tomentosa*)

Jefferson Yunis Aguinaga

Jaboticabal, São Paulo

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA

Avaliação do crescimento e da atividade imune de tilápias alimentadas com dietas suplementadas com unha de gato (*Uncaria tomentosa*)

Jefferson Yunis Aguinaga

Orientador: Dr. João Batista Kockenborger Fernandes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal, São Paulo
2013

SUMÁRIO

ABSTRACT:	3
INTRODUÇÃO	5
MANUSCRITO 1:.....	10
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	17
DISCUSSÃO	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
MANUSCRITO 2.....	30
RESUMO	30
ABSTRACT	31
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS:	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
MANUSCRITO 3.....	52
RESUMO	52
ABSTRACT	53
INTRODUÇÃO	54
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS.....	64
DISCUSSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

RESUMO

Neste estudo objetivou-se avaliar o efeito da unha de gato, *Uncaria tomentosa*, sobre a toxicidade em *Hyphessobrycon eques* e o efeito sobre o crescimento e a atividade imune em tilápias. Pela técnica da cromatografia líquida verificou-se a autenticidade da planta e quantificaram-se os principais componentes químicos. O extrato aquoso mostrou ser praticamente não tóxico para o *H. eques*, com CL50 de 18,16 mg/L. Na determinação do melhor tempo de suplementação pela análise do componente celular e dos parâmetros hematológicos na aerocistite em tilápias, verificou-se que o máximo do acúmulo celular ocorreu após três semanas. Para a análise do desempenho zootécnico e da resposta inflamatória aguda, tilápias foram alimentadas durante três semanas com dietas contendo: 0; 75; 150; 300 e 450 mg de extrato de unha de gato/kg da ração. Após o final do período experimental, os peixes foram desafiados com *Streptococcus agalactiae* inativado e as 6; 24 e 48 horas após o desafio foram coletadas as amostras. Às 6 horas observou-se incremento, dependente de dose, no número de leucócitos no sangue e às 24 horas incremento de leucócitos no local da inflamação. Além disso, os centros melanomacrófagos foram maiores em tamanho e número nos grupos tratados. Observou-se também aumento da expressão de Imunoglobulina M no baço após 24 horas do desafio nos grupos que receberam 300 e 450 mg/Kg. Não houve alterações histopatológicas em brânquias, intestino, baço e fígado. Verificou-se aumento no ganho de peso, que pode ter sido atribuído ao incremento do tamanho dos vilos intestinais. Finalmente, estes resultados são a primeira evidência do efeito da *U. tomentosa* sobre o ganho de peso e ativação do sistema

imune inato e específico em tilápias. Os resultados histopatológicos sugerem que a planta pode ser usada oralmente em peixes sem efeitos colaterais indesejáveis.

Palavras chave: Unha de gato, *S. agalactiae*, atividade imune, desempenho zootécnico, tilápias, *Hyphessobrycon eques*.

ABSTRACT:

This study aimed to evaluate the effect of the toxicity of *U. tomentosa* on *H. eques* and its effect on growth performance and innate immunity in tilapia. It was found, by the technique of chromatography, verified the authenticity of the plant and quantified the main chemical components. The aqueous extract was nontoxic to matogrosso, with LC50;48h of 18,16 mg/L. To determinate the best period of feeding, It was analyzed the cellular component and haematological parameters in aerocistite in tilapia and It was found that the maximum accumulation of cellular and best hematologic results occurred after three weeks. To evaluate the effect of this plant on immune activity and growth performance of Nile tilapia, we used 450 fish ($81,3 \pm 4,5g$) randomly distributed at 25 fish per 1500-L tank and fed a diet containing 0.0, 75, 150, 300 and 450 mg “uña de gato”/kg diet for 3 weeks. It was used three replicates per treatment and control groups. After the 3-week experimental period, fish of each treatment were challenged by inactivated *Streptococcus agalactiae*. Samples were taken at 6, 24 and 48 hours after the inflammatory stimulus. We found a dose-dependent increase in blood leukocytes after 6 hours post-inoculation and a large dose-dependent increased of leukocytes at site of inflammation at 24 hours post-inoculation. Further, splenic melanomacrophage centers were significant higher in size and number in treated groups.

Furthermore, a significant increase of IgM expression in spleen was detected at 24 hours post-bacterial challenge in supplemented fish with 300 and 450 mg *U. tomentosa*/Kg diet. There were no histopathological changes in any treatment in gills, intestine, spleen and liver. We found an unexpected increase of weight gain and feed conversion that would be explained, partially, due to increase of intestinal villus size. Finally, the reported results provide the first evidence that *Uncaria tomentosa* added to Nile tilapia diet, particularly 300 mg/kg feed for 3 weeks, activates non-specific immunity, growth as well as specific immune response. Additionally, histopathological results suggest that the plant could be used orally without undesirable side effects.

Keywords: Cat's claw, *S. agalactiae*, growth performance, tilapia, immune activity *Hyphessobrycon eques*.

INTRODUÇÃO

A aquicultura mundial está num processo de constante crescimento, sendo os peixes, uma das mais importantes fontes de proteína animal (FAO, 2010). A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, pertencente à família Cichlidae, é o segundo grupo de peixes mais produzido no mundo com 1 300 000 TM anuais. Atualmente é o mais produzido no Brasil devido a suas qualidades como: alta taxa de crescimento, flexibilidade às mudanças ambientais, fácil reprodução e rusticidade (Zimmermann e Fitzsimmons, 2004; El-Sayed, 2006).

Na maioria das piscigranjas, esta espécie é criada em sistemas intensivos ou semi-intensivos, onde as dietas artificiais devem satisfazer as exigências nutricionais. Neste sistema de produção, os peixes são expostos continuamente a alterações na qualidade da água e a práticas de manejo como manuseio excessivo, transporte e adensamento, que induzem respostas de estresse, com consequências negativas sobre o desempenho produtivo, resposta imune e resistência às doenças (Barton et al., 2000; Gatlin, 2002; Brandão et al., 2006).

Nesses sistemas de criação, o uso de produtos químicos e antibióticos tem aumentado em função da elevada ocorrência de doenças parasitárias e infecciosas (Moraes & Martins, 2004; Pilarski et al., 2009; Moraes & Moraes, 2009). Entretanto, o uso indiscriminado destes produtos ocasiona problemas aumentando a pressão de seleção sobre os microrganismos, incrementando a resistência bacteriana, proliferação das bactérias resistentes devido à morte das não resistentes ao antibiótico, havendo também a possibilidade de transferência dos genes de resistência às outras bactérias nunca expostas ao antibiótico (Verschuere et al., 2000).

Além disso, a presença de resíduos de antibióticos nos tecidos de peixes comercializados produz restrições na comercialização da carne e impacto negativo no meio ambiente (Smith et al., 2003; Sorum, 2006). Desta forma é necessário buscar possíveis substitutos aos quimioterápicos mantendo-se as ações benéficas e eliminando as indesejáveis. Isto vem sendo realizado com o uso de imunostimulantes (Li e Gatlin, 2006).

Os imunostimulantes são substâncias que podem incrementar as respostas inespecíficas de defesa dos animais (Vainikka et al., 2005; Moraes & Moraes, 2009). Os efeitos benéficos dos nutracêuticos consistem em aumentar a atividade de macrófagos, fagocitose por neutrófilos e monócitos e maior produção de linfócitos, imunoglobulinas e lisozima (Sakai, 1999), aumentando a resistência desses animais frente a infecções por organismos oportunistas proporcionando, desta forma, o crescimento saudável dos peixes (Amar et al., 2001; Vainikka et al., 2005).

Dentre os compostos com características imunostimulantes, destacam-se os elementos nutricionais como as vitaminas, substâncias derivadas de bactérias, polissacarídeos, extratos de plantas e animais, além das substâncias químicas sintéticas (Cook et al., 2003; Smith et al., 2003; Belo et al., 2005; Salvador et al., 2012).

O uso de extratos de plantas para fins medicinais é pouco explorado em peixes, no entanto no Brasil cresce 8% ao ano (Mariz et al., 2006), sendo uma boa alternativa para o controle de doenças devido ao baixo custo operacional, facilidade no preparo, utilização e segurança ambiental. Contudo, é necessária a análise química das plantas para quantificação de substâncias conhecidas, assim

como identificar novos compostos (Mascarenhas et al., 2012). Além disso, para a utilização com finalidade terapêutica, é fundamental avaliar a toxicidade dos fitoterápicos, já que alguns produtos apresentam concentrações terapêuticas próxima da letal (Fajer-Avila et al., 2003).

A *Uncaria tomentosa* conhecida como unha de gato é uma planta da floresta amazônica pertencente à família Rubiaceae (Andersson & Persson, 1991). O interesse econômico desta planta decorre da sua utilização como fitoterápico em humanos no tratamento de artrite, câncer, AIDS, doenças virais e úlcera gástrica (Muhammad et al., 2001; Heitzman et al., 2005). Foram reconhecidos diversos princípios ativos, principalmente alcalóides oxindólicos, derivados do ácido quinóico e polifenóis de baixo peso molecular em todas as partes da planta, que têm atividade imunoestimulante, antileucêmica e antiviral (Kepingler, 1999; Akkeson et al., 2005; Eberlin et al., 2005, Kloucek et al., 2005).

Estudos toxicológicos em ratos demonstraram ocorrer sinais de toxicidade aguda ou crônica quando a unha de gato foi incluída com doses de até 8,0 g.Kg⁻¹ em 28 dias (Kepingler, 1999; Sheng et al., 2000). Os peixes apresentam particularidades como o tipo de respiração e a alta perfusão com o meio ambiente, além de serem altamente sensíveis a substâncias tóxicas.

Assim, têm sido empregado com sucesso alternativas ao uso de antibióticos em aquicultura para controlar os principais agentes infecciosos, entre elas, o uso de suplementos e alimentos funcionais (Gildberg et al., 1997; Gram et al., 1999; Nikoskelainen et al., 2001; Claudiano et al., 2009).

Dentre os principais agentes infecciosos, o *Streptococcus agalactiae* causa uma doença grave em tilápias, causando grandes prejuízos na produção. O

controle desta infecção com antibióticos é pouco eficiente e favorece a seleção de microorganismos resistentes, com a possibilidade de transferência de genes de resistência às bactérias nunca expostas ao antibiótico (Suresh, 1998; Verschueren et al., 2000).

Apesar de existirem alguns estudos sobre o potencial imunomodulador do extrato de *Uncaria tomentosa*, esta ainda é pouco estudada, e não se conhece seus potenciais benefícios na aquicultura, sobretudo no melhoramento da resistência dos peixes às doenças mais comuns.

OBJETIVOS GERAIS:

- Utilizar o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PDA) para verificar e quantificar a composição química do extrato aquoso da casca de *U. tomentosa* e determinar sua concentração letal média utilizando como modelo experimental o *Hyphessobrycon eques*.
- Avaliar o efeito das dietas com diferentes níveis de extrato de *Uncaria tomentosa* sobre a eficiência produtiva e a resistência às enfermidades na tilápia do Nilo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Quantificar os princípios ativos do extrato de *U. tomentosa* pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-PDA).
- Determinar a concentração letal média do extrato de *U. tomentosa* para *Hyphessobrycon eques* (modelo experimental).

- Avaliar o efeito do uso do extrato de *U. tomentosa* na eficiência produtiva da tilápia do Nilo.
- Avaliar o efeito do extrato de *U. tomentosa* dietario sobre a atividade imunológica da tilápia do Nilo.
- Determinar o tempo de fornecimento mais adequado de *U. tomentosa* na ração de tilápias do Nilo.
- Determinar a quantidade mais adequada de *U. tomentosa* na ração de tilápias do Nilo.

MANUSCRITO 1: “Journal of Ethno-Pharmacology”

Quantificação dos princípios ativos e toxicidade aguda do extrato aquoso da casca de *Uncaria tomentosa* em *Hyphessobrycon eques*

Jefferson Yunis Aguinaga¹, Gustavo S. Claudiano², Cynthia Ikefuti⁴, Paulo F. Marcusso², George G. Ortega³, Claudinei da Cruz⁴, Julieta E.R. de Moraes², Flávio R. de Moraes² e João B. Kochenborger Fernandes¹.

¹ Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

³ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Importância Etnofarmacológica: A *Uncaria tomentosa* (unha de gato) é uma planta usada na medicina popular por tribos da Amazônia devido à sua ampla gama de atividades biológicas.

Objetivo do estudo: Investigar e quantificar pela técnica de cromatografia líquida (CLAE-PDA), os princípios ativos do extrato aquoso da casca de *U. tomentosa* e determinar a sua concentração letal 50 (CL50; 48h) em *Hyphessobrycon eques*.

Materiais e métodos: As análises da planta foram realizadas por CLAE-PDA, previamente validadas para *U. tomentosa*. A determinação da CL50 foi realizada usando testes preliminares. Finalmente, foram testadas concentrações de uma solução estoque a 10% nas diluições: 0,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0; 22,0 mL/L no peixe de água doce *H. eques*.

Resultado: A cromatografia evidenciou que os níveis de alcalóides oxindólicos, derivados de ácidos quinóico e polifenóis de baixo peso molecular foram $19,66 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$; $7,46 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ e $13,25 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A concentração letal foi calculada pelo método Spearman-Kärber, demonstrando que a CL50-48h foi 18,16 mL/L, com um limite inferior de 17,10 mL/L e superior de 19,27 mL/L. Os peixes apresentaram sinais clínicos de intoxicação em concentrações acima de 20,0 mL/L, acompanhados por diminuição significativa dos níveis de oxigênio dissolvido e pH da água dos aquários experimentais. Na concentração mais elevada, 22 mL/L, observou-se 100% de mortalidade, tendo como possíveis causas à redução da concentração de oxigênio pela presença de alcalóides oxindoles e polifenóis, acumulação do extrato nas brânquias dos peixes tratados e/ou à interação destes compostos com a dopamina sistêmica.

Conclusões: O extrato aquoso da casca de *U. tomentosa* mantém os principais princípios ativos da planta. O teste de toxicidade mostrou que a *U. tomentosa* é praticamente não tóxico para *H. eques*.

Palavras-chave: Unha de gato, CL50, cromatografia, fitoterápico, toxicidade.

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Uncaria tomentosa* (cat's claw) is a medicinal plant used in folk medicine by Amazon tribes due to its wide range of biological activities.

Aim of study: Investigate and quantify by chromatographic technique (HPLC-PDA), the chemical constituents of aqueous extract of *U. tomentosa* bark and determine its lethal concentration 50 (48-h LC50) in *Hyphessobrycon eques*.

Materials and methods: The analyses of the plant were performed by HPLC-PDA, previously validated for *U. tomentosa*. LC50 determination was carried out using preliminary tests. Finally, different concentrations of a 10% stock solution (0.0 , 14.0, 16.0, 18.0, 20.0, 22.0 mL per liter of water) in freshwater fish *H. eques* were tested.

Results: The chromatography showed that the levels of oxindole alkaloids, quinovic acid derivatives and low molecular weight polyphenols were $19.66 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$, $7.46 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ and $13.25 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$, respectively. The lethal concentration was calculated by Trimmed Spearman-Kärber method, demonstrating that CL50-48h was 18.16 mL/L, with a lower limit of 17.10 mL/L and higher limit of 19.27 mL/L. The fish showed changes in the behavior at concentrations above 20.0 mL/L, accompanied by a significant decrease in the levels of dissolved oxygen and pH. At the highest concentration; 22 mL/L, it was observed 100% mortality attributed to oxygen reduction by the amount of oxindole alkaloids, polyphenols, accumulation of the extract in the gills of treated fish and/or the interaction of these compounds with the dopamine system.

Conclusions: The aqueous extract of *U. tomentosa* bark did not alter the chemical components of the plant and the toxicity test showed that *U. tomentosa* is non-toxic to *H. eques*, therefore it can be used safely in fish therapy.

Key-words: Cat's claw, CL50, Chromatography, Phytotherapeutic, Toxicity.

INTRODUÇÃO

O uso de extratos de plantas para fins profiláticos é ainda pouco explorado em peixes, no entanto no Brasil cresce 8% ao ano (Mariz et al., 2006), é uma

alternativa para o controle de doenças devido ao baixo custo operacional, facilidade no preparo, utilização e segurança ambiental.

A *Uncaria tomentosa*, popularmente conhecida como unha de gato, é uma planta da floresta amazônica pertencente à família Rubiaceae (Andersson e Persson, 1991). É um fitoterápico muito utilizado na medicina humana para o tratamento de diversas doenças (Muhammad et al., 2001; Heitzman et al., 2005), apresentando atividade imunoestimulante, antileucêmica e antiviral, decorrente dos diversos princípios ativos encontrados como: alcalóides oxindólicos, glicosídicos de ácido quinóico e polifenóis de baixo peso molecular em todas as partes da planta (Kepingler, 1999; Akkeson et al., 2005; Eberlin et al., 2005; Kloucek et al., 2005).

Com a intensificação da aquicultura nos últimos anos (Ferreira e Barcellos, 2008), há aumento da ocorrência de enfermidades parasitárias e infecciosas. Assim, produtores recorrem ao uso indiscriminado de produtos químicos que acarretam seleção de microrganismos resistentes, presença de resíduos em tecidos de peixes comercializados que resultam em restrições na comercialização e impacto ambiental negativo (Smith et al., 2003; Sorum, 2006).

Na tentativa de diminuir e/ou evitar o uso de fármacos e seus efeitos adversos o uso de fitoterápicos surge como alternativa (Claudio et al., 2009). Para tanto, é necessário a análise química das plantas para quantificação de substâncias conhecidas e identificação de novos compostos (Mascarenhas et al., 2012). Além disso, para a utilização com finalidade profilática em peixes é fundamental avaliar a toxicidade dos fitoterápicos, pois alguns produtos apresentam concentrações terapêuticas próxima da letal (Fajer Avila et al., 2003).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi quantificar a composição química do extrato aquoso do caule de *U. tomentosa* pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-PDA) e determinar a toxicidade aguda (CL50-48h) para o peixe matogrosso (*Hyphessobrycon eques*).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e extração

O extrato comercial de casca *U. tomentosa* proveniente do Peru foi usado neste estudo ("Casa Massaro", lote 0442). O extrato foi moído, e o processo de secagem ocorreu em temperatura ambiente, sendo posteriormente armazenado em sacos de plástico. Para preparar a solução-mãe, o extrato foi suspenso em água deionizada e deixada em repouso 24 horas (10mg/mL). Em seguida, a solução-mãe foi filtrada (papel de 0,14 mm de porosidade Qualy ®) e utilizado no ensaio biológico.

CLAE-PDA dos alcalóides oxíndoles, derivados do ácido quinóico e polifenóis de baixo peso molecular no material vegetal

O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-PDA) foi utilizado nas análises qualificativas e quantitativas do extrato aquoso do caule de *U. tomentosa*. Para determina os alcalóides oxíndoles foi empregando o método previamente validado por Kaiser et al., 2013. Utilizou-se uma coluna Gemini-NX RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 um) (Phenomenex, EUA), protegida por uma precoluna RP-18. A fase móvel consistiu num tampão de acetato de amónio 10 mM (pH 7,0)

(A) e acetonitrilo (B) em um programa de gradiente linear, a detecção efetuada a 245 nm; utilizou-se o mitraphyllina (Phytolab, lote 2946, Alemanha) como padrão externo.

Na determinação dos derivados do ácido quinóico utilizou-se coluna Sinergy Fusão RP-18 (150 x 3,9 mm id, 5 um) (Phenomenex, EUA), protegida por uma precoluna RP-18. A fase móvel foi constituída por ácido fórmico a 0,01% (v/v) (A) e acetonitrilo (B): ácido fórmico 0,01% (90:10, v/v) num programa de gradiente linear, detecção a 245 nm; utilizado a α -hederin (Extrasynthèse, lote 08040314, França) como padrão externo (Pavei et al., 2012).

Os polifenóis de baixo peso molecular, foram analisados em aparelho para CLAE-PDA (Proeminence-Shimadzu, Tóquio, Japão), segundo o método anteriormente validado por Pavei et al., 2010. Foi utilizada uma coluna Gemini RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 um) (Phenomenex, EUA), protegida por uma precoluna RP-18. A fase móvel consistiu em 0,1% v/v de ácido trifluoroacético (A) e metanol: TFA (99,9:0,1, v/v) (B) em um programa de gradiente linear, detecção efetuada a 325 nm; utilizaram o ácido clorogénico (Fluka, lote 455159/1, Suíça), ácido caféico (Extrasynthèse, lote 0381024, França) e rutina (Sigma, lote 128K1177, EUA) como padrões externos.

Determinação da CL50-48h

Inicialmente, para a realização dos ensaios preliminares da toxicidade aguda, foram utilizados 108 exemplares de matogrosso (*H. eques*) ($1,76 \pm 0,6$ gramas) que foram aclimatados em caixa de plástico 250L, durante 14 dias de acordo com as recomendações da ABNT (2011). Durante este período, os peixes

foram alimentados com dieta comercial na proporção de 3% de biomassa/dia, apresentando 28% de proteína bruta e 4000 kcal kg⁻¹ de energia bruta e submetidos a um banho profilático de cloreto de sódio (1%) não-iodado durante 60 minutos (Francis-Floyd, 1995).

Nos ensaios preliminares, os peixes foram distribuídos ao acaso em 36 tanques de vidro de 3L com concentrações de 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0; 12,0; 15,0; 20,0; 23,0; 25,0; 50,0; 75,0 mL/L de uma solução estoque a 10% (100g.L⁻¹). Os intervalos obtidos foram utilizados para a realização do ensaio definitivo (ABNT, 2011).

O ensaio definitivo de CL50;48h foi realizado utilizando 54 peixes (1,86 ± 0,1 gramas) distribuídos aleatoriamente em 18 tanques de 3L com concentrações de 14,0, 16,0, 18,0, 20,0, 22,0 mL/L de solução do extrato. Os ensaios foram feitos com três réplicas e três peixes por cada réplica.

O oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e pH da água foram monitorados diariamente (YSI 556 MPS Sistema multisonda); a temperatura da água foi mantida de acordo com as recomendações do ABNT (2011). Os peixes foram avaliados diariamente por observação direta, na procura de sinais de intoxicação, como alterações clínicas, lesões macroscópicas externas, localização no aquário, movimentos operculares, natação errática e mortalidade.

Delineamento e Análise Estatística

A determinação quantitativa das áreas dos picos nos cromatogramas foi realizada utilizando as equações de regressão do ácido clorogénico (CLA), ácido cafeínico (CFA), e as curvas de calibração de rotina (RUT) (Pavei et al., 2012).

Os cálculos dos níveis de alcalóides oxindólicos (AO), derivados do ácido quinóico (DAQ) e polifenóis de baixo peso molecular (PBM) foram realizados utilizando a equação: $A = \frac{1}{2} h \cdot W_b$, para calcular a área de um pico (Pavei et al, 2010). O delineamento experimental foi realizado em DIC.

As medições de toxicidade geral obtidas foram analisadas pelo método de Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). Os resultados de mortalidade foram analisados considerando cada aquário como uma unidade experimental e nos gráficos foi apresentada a mortalidade em cada concentração expressa em porcentagem.

RESULTADOS

Análise cromatográfica

A análise de HPLC-PDA do extrato aquoso de casca de *U. tomentosa* revelou três compostos característicos desta planta, confirmando assim, a identidade da amostra. Estes compostos foram alcalóides oxindólicos (AO) (Figura 1), derivados de ácido quinóico (DAQ) (Figura 2) e polifenóis de baixo peso molecular (PMB) (Figura 3).

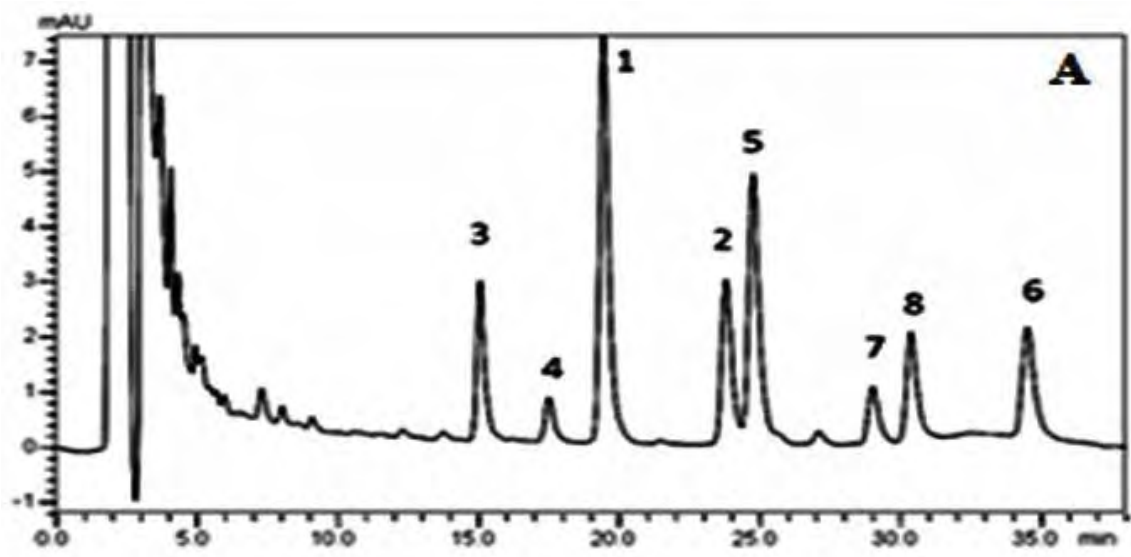


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato aquoso da *U. tomentosa* em 245 nm. Alcalóides oxindólicos.

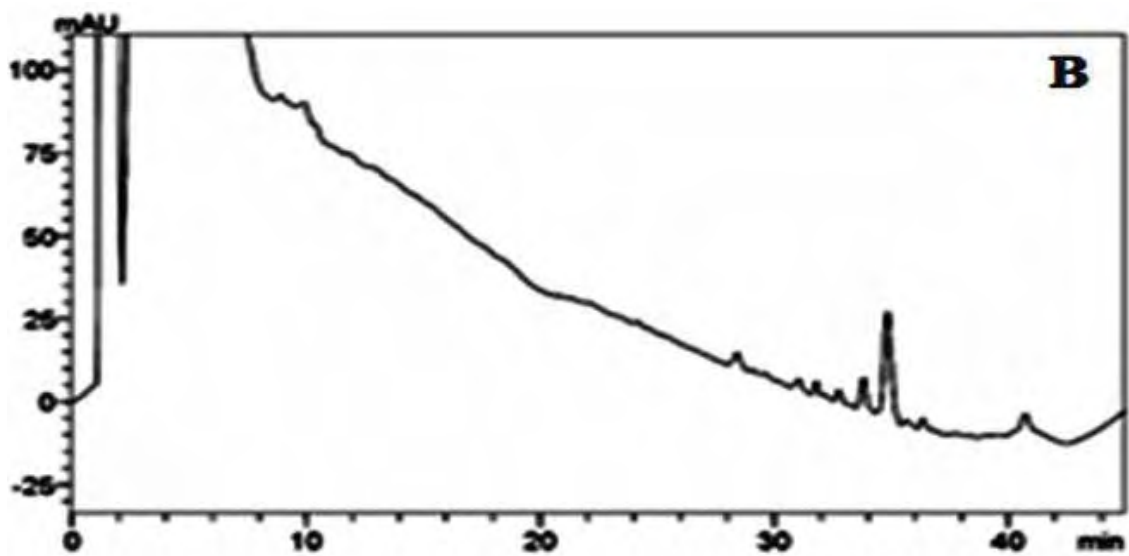


Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato aquoso da *U. tomentosa* em 245 nm. Derivados do ácido quinólvico.

A análise do extrato aquoso de *U. tomentosa* mostrou que os AO foram os mais concentrados ($19.66 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$), seguido pelos PMB ($13.25 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$) e em menor concentração os DAQ com media total de $7.46 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ (Figura 4).

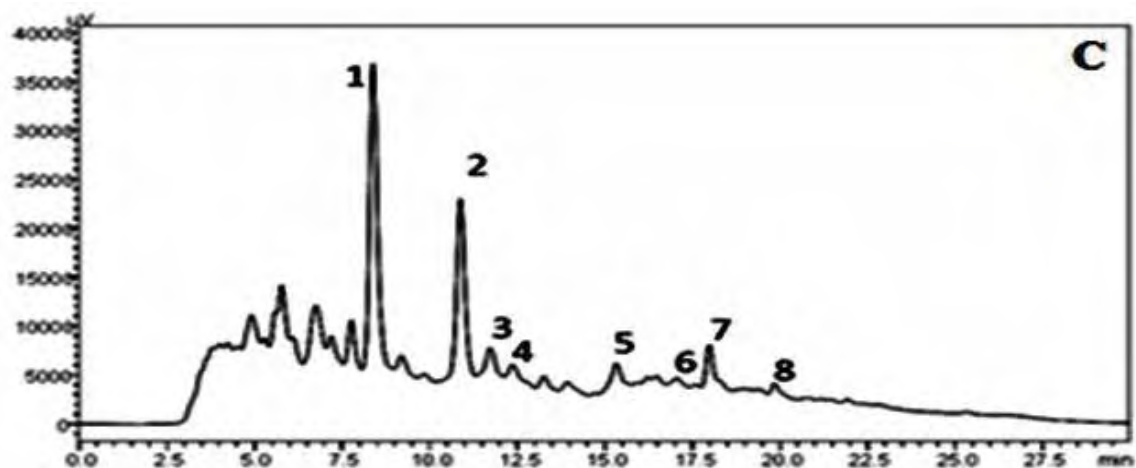


Figura 3. Perfil cromatográfico do extrato aquoso da *U. tomentosa* em 325 nm. Polifenóis de baixo peso molecular (Pavei et al., 2010).

Determinação da CL50;48h

Na determinação da toxicidade aguda (CL50;48h), pela análise da equação linear, verificou-se uma relação concentração-resposta do extrato aquoso da casca de *U. tomentosa*, de modo que, com o aumento da concentração do extrato ocorreu aumento na taxa de mortalidade chegando a 100% no nível mais alto (22 mL/L) (Figura 5).

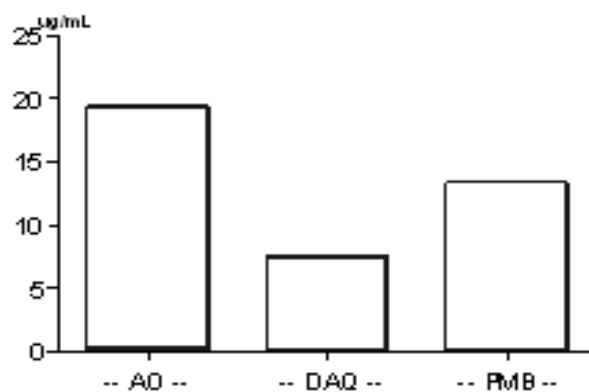


Figura 4. Concentrações de derivados do alcalóides oxindólicos (AO), derivados do ácido quinóico (DAQ) e polifenóis de baixo peso molecular presentes no extrato aquoso de *U. tomentosa*. Os resultados estão expressos com a média \pm desvio padrão.

Ao término do ensaio, o valor estimado da CL50;48h do extrato aquoso do casca de *U. tomentosa* para matogrosso foi de 18,16 mL/L, com limite inferior 17,10 mL/L e superior de 19,27 mL/L, o qual determina a CL50;48h de extrato aquoso de *U. tomentosa* para Matogrosso em 1816 mg/L.

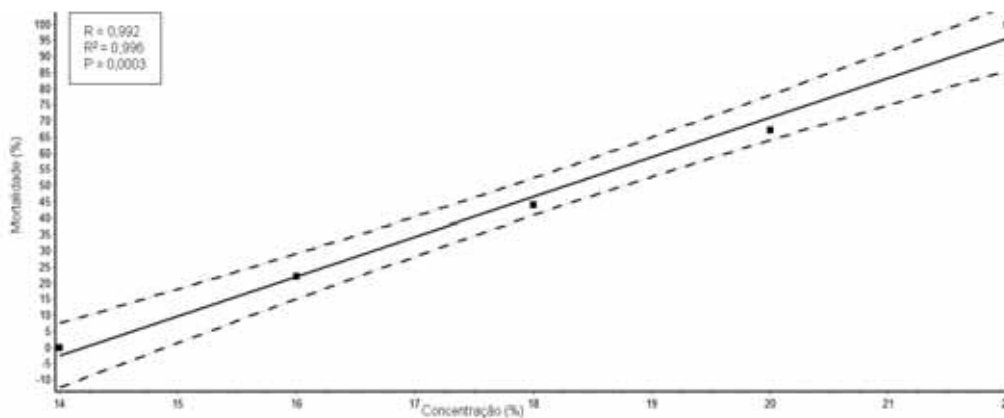


Figura 5- Correlação linear simples positiva, apresentando a linha de tendência de regressão linear, valor de p (P), coeficiente de correlação (R) e coeficiente de determinação (R^2) do efeito da mortalidade em função da concentração do extrato de unha de gato (*U. tomentosa*).

Após 48 horas de exposição, ocorreu diferença na mortalidade entre concentrações. Na concentração inicial (14,0 mL/L) não ocorreu mortalidade, diferente do que ocorreu na última concentração (22,0 mL/L), com 100% de mortalidade (Tabela 1).

Tabela 1 - Mortalidade acumulada de *H. eques* em diferentes tempos de exposição.

Concentração (mL/L)	Tempo exposição (horas)			%
	24	48	Total	
0	0	0	0	0
14	0	0	0	0
16	1	1	2	22
18	1	3	4	44
20	5	1	6	66
22	8	1	9	100

Tx % Taxa de mortalidade

Ao final do período experimental, a condutividade elétrica ($185,2 \pm 10,5$ uS) e a temperatura ($22,7 \pm 0,1$ °C) permaneceram similares durante todo o experimento (tabela 2). A concentração de oxigênio dissolvido diminuiu conforme aumento da concentração do extrato da planta em todos os grupos tratados e em relação ao controle (6,3 a 2,2 mg.L⁻¹). Na comparação do grupo controle com os demais tratamentos foi evidenciada diminuição no pH (8,3 a 7,5).

Tabela 2 Variáveis dos parâmetros físicos-químicos da água dos aquários

Parâmetros	Concentrações da solução estoque (mL/L)					
	0	14	16	18	20	22
Temperatura (°C)	22,7	22,8	22,8	22,8	22,7	22,8
Condutividade (uS)	175,2	185,4	184,2	189,5	190,1	190,2
Oxigênio Dissolvido (ml/L)	6,3	2,6	2,9	2,4	2,4	2,2
Potencial hidrogeniônico	8,3	7,7	7,7	7,5	7,3	7,4

DISCUSSÃO

A transformação de plantas em medicamento deve ser feita de maneira a se identificar os princípios metabólitos ativos e preservar suas características químicas e farmacológicas, garantindo a sua ação biológica, segurança clínica e a valorização de seu potencial terapêutico (Santos e Mello, 2007). Assim, no preparo da casca de *U. tomentosa* em extrato aquoso, constatou-se pelo uso do sistema cromatográfico que os princípios ativos foram preservados, pois os componentes químicos encontrados foram relatados anteriormente, como os alcalóides oxíndoles (Montoro et al., 2004; Valério e Gonzales, 2005), derivados do ácido quinóico (Aquino et al., 1989) e polifenóis de baixo peso molecular (Pavei et al., 2010).

As concentrações de cada composto encontrado neste trabalho, assemelham-se aos valores obtidos por Paive et al. (2012), em seu estudo da validação da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em reversa HPLC-PDA com a utilização da mesma espécie de planta.

Estudos prévios têm reportado a baixa toxicidade desta planta em ratos (Kepingler, 1999; Sheng et al., 2000). No caso dos peixes, há particularidades como o tipo de respiração e a alta perfusão com o meio ambiente, além de serem organismos altamente sensíveis a substâncias tóxicas.

No estudo de toxicidade para o mato-grosso, os valores da concentração letal média do extrato aquoso do caule de *U. tomentosa* foram considerados como “praticamente não tóxico”, com base na classificação de Zucker (1985). Este autor considera os valores de CL50 abaixo de 100 mg/L como praticamente não tóxico para peixes e organismos aquáticos invertebrados. Além disso, há descrições de

valores inferiores ou similares para fitoterápicos amplamente utilizados e considerados seguros como a cúrcuma, *Curcuma longa* Linn, testado em caramujos com valor estimado de CL50 igual a 319,82 mg/L, (Silva Filho et al., 2009). O extrato aquoso de folhas de nim, *Azadirachta indica*, CL50(96h) na proporção de 2740 mg.L⁻¹ é seguro para *O. niloticus* (Winkaler et al., 2005). Enquanto, o extrato aquoso de *Terminalia catappa* para o guaru, *Phalloceros caudimaculatus*, apresentou com CL50 de 208,52 mg/L (Claudiano et al., 2012).

A mortalidade não foi atribuída ao pH, pois valores observados entre o controle e os grupos tratados, mesmo em concentrações mais elevadas, são semelhantes. Embora haja influência do pH sobre a toxicidade devido ao desequilíbrio eletrolítico, este fato parece não ter ocorrido neste estudo. Assim, é possível que a causa da mortalidade esteja influenciada à diminuição da concentração de oxigênio dissolvido ao longo do tempo e à medida que se aumentou a concentração do extrato, principalmente quando comparados com o grupo controle (Milson, 1993).

Nos grupos que continham unha de gato foram observadas alterações clínicas e comportamentais características de hipoventilação, pois os animais se distribuíam na superfície da água e apresentavam aumento dos movimentos operculares. Este quadro piorou com o aumento da concentração do extrato e com o tempo de exposição. Este fato pode ser explicado pela decomposição da matéria orgânica do extrato da planta, que demanda a utilização de oxigênio presente no ambiente. Outro fator importante é o excesso de extrato na água fazendo com que este se acumule nas brânquias com diminuição das trocas gasosa e iônica (Claudiano et al., 2012).

É possível também que tenham diminuído os mecanismos fisiológicos de compensação em casos de hipóxia devido ao bloqueio do receptor, tornando possível uma interação competitiva entre os compostos químicos do extrato por meio de mecanismos físico-químicos com os quimiorreceptores de O₂ que se localizam por todos os arcos branquiais (Claudiano et al., 2012).

Além disso, os compostos polifenólicos solúveis em água e solventes orgânicos polares são capazes de precipitar proteínas (Zucker, 1983), levando ao acúmulo destes compostos com piora no quadro. Outro evento que pode ter afetado a homeostase dos peixes é a interação dos compostos químicos derivados dos alcalóides oxindólicos com o sistema dopaminérgico, levando a depressão no sistema nervoso central e alteração da pressão sanguínea com diminuição da frequência cardiorrespiratória (Sakakibara et al., 1998, 1999).

Estes sinais são reforçados pelas alterações clínicas e comportamentais apresentadas pelos animais, após 24 horas de exposição ao produto, nas concentrações acima de 20,0 mL/L, em que os peixes apresentaram-se letárgicos, localizados na superfície da água e com visível aumento dos movimentos operculares, sinais clínicos compatíveis com os apresentados por diversas espécies de teleósteos em ambiente hipóxico (Rantin et al., 1992) e corroborando os dados observados por Claudiano et al. (2012), na determinação da CL50 das folhas secas de *T. catappa* em *Phalloceros caudimaculatus*.

Concluiu-se pela análise cromatográfica que o preparo do extrato aquoso da casca de *U. tomentosa* não alterou os componentes químicos da planta, apresentando alcalóides oxindólicos, derivados do ácido quinóico e de polifenóis

de baixo peso molecular. A concentração letal 50% (CL50;48h) para a espécie de peixe *H. eques* foi de 1816 mg/L.

Após 48 horas de exposição o uso agudo da infusão da casca foi considerado como “praticamente não tóxico” para matogrosso, portanto é possível o futuro uso do extrato de *U. tomentosa* de forma segura na profilaxia e/ou tratamento de peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKESSON C.; LINDGREN H.; PERO R.; LEANDERSON T.; IVARS F. Quinic acid is a biologically active component of *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100R. **Int.Immunopharmacol.** 5, p. 219-229, 2005.

ANDERSSON L.; PERSSON C. Circumscription of the tribe Cinchoneae (Rubiaceae) – A cladistic approach. **Pl. Syst. Evol.** 178, p. 65–94, 1991.

AQUINO R.; DE SIMONE F.; PIZZA C.; CONTI C.; STEIN M. Plant metabolites, Structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. **J. Nat. Prod.** 52, p. 679–685, 1989.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 10007: **Amostragem de Resíduos - Procedimento.** Rio de Janeiro. 25p, 2011.

CLAUDIANO G.; DIAS NETO J.; SAKABE R. et al. Eficácia do extrato aquoso de "*Terminalia catappa*" em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. **Rev. Bras. Saúde Prod Anim.** V. 10, n. 3, p. 625-636, 2009.

CLAUDIANO, G.S.; PILARSKI, F.; CRUZ, C.; SALVADOR, R.; BELO, M.A.A.; MORAES, F.R. Concentração letal CL50 do extrato aquoso de folhas de *Terminalia*

catappa em guaru, *Phalloceros caudimaculatus*. **Arch. Vet. Sci.** V. 17, n. 3, p. 15-19, 2012.

EBERLIN S.; DOS SANTOS L.; QUEIROZ M. *Uncaria tomentosa* extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Int Immunopharmacol.** V. 5, n 7-8, p.1235-1246. 2005.

FAJER-ÁVILA, E.J.; PARRA, I.A.; AGUILAR-ZARATE, G.; CONTRERAS-ARCE, R.; ZALDÍVAR-RAMÍREZ, J.; BETANCOURT-LOZANO, M. Toxicity of formalin to bulls eye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. **Aquacult.** V. 223, p. 41-50. 2003.

FERREIRA, D.; BARCELLOS, L. J. G. Enfoque entre as boas práticas de manejo e as medidas mitigadoras de estresse na piscicultura. **B. Inst. Pesca.** V. 34, n. 4, p. 601-611. 2008.

FRANCIS-FLOYD, R. The use of salt in aquaculture. Fact Sheet VM 86. **Series of the Department of Large Animal Clinical Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.** URL: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/VM/VM00700.pdf>. 1995.

HAMILTON M.; RUSSO R.; THURSTON V. Trimmed Spearman – Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.** V. 7, p. 714–719. 1977.

HEITZMAN M.; NETO C.; WINIARZ E.; VAISBERG A.; HAMMOND G. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochem.** V. 66, p. 5-29. 2005.

KAISER S.; VERZA S.; MORAES R.; DE RESENDE P.; BARRETO F.; PAVEI C.; ORTEGA G. Cat's claw oxindole alkaloid isomerization induced by common extraction methods. *Quimica Nova*. 2013, (artigo aceito).

KEPLINGER K.; LAUS G.; WURM M.; DIERICH M.; TEPPNER H. *Uncariatomentosa* (Willd.) DC.—Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J. ethnopharmacol.* V. 64, p. 23–34. 1999.

KLOUCEK P.; POLESNY Z.; SVOBODOVA B.; VLKOVA E.; KOKOSKA L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *J. ethnopharmacol.* V. 3, n. 99(2), p. 309-12. 2005.

MARIZ S.R.; CERQUEIRA G.S.; ARAÚJO W.C.; DUARTE J.C.; MELO A.F.M.; SANTOS H.B.; OLIVEIRA K.; MELO DINIZ M.F.F.; MEDE I.A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. *Rev. bras. Farmacogn.* V. 16, n. 3, p. 372-8. 2006.

MASCARENHAS, M.H.T; LARA, J.F.R; MACEDO, G.A.R; VIANA, M.C.M; FREIRE, F.M; KARAM, D. Efeito de culturas antecessoras à cana-de-açúcar na composição florística de plantas daninhas. *Rev. bras. Herbicida.* V. 11, n. 2, p. 241-248. 2012

MILSOM W. K. Afferent inputs regulating ventilation in vertebrates. In: **J. E. P. W. Bicudo (ed.), The vertebrate gas transport cascade. Adaptations and mode of life.** CRC Press, Boca Raton. pp. 94-105. 1993.

MONTORO P.; CARBONE V.; QUIROZ D.; DE SIMONE F.; PIZZA C. Identification and quantification of components in extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS. *Phytochem Anal.* V. 15, n. 1, p. 55-64. 2004.

MUHAMMAD I.; DUNBAR D.; KHAN R.; GANZERA M.; KHAN I. Investigation of Uña de Gato I7-deoxyloganic acid and ¹⁵N NMR spectroscopic studies on

pentacyclcoxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Phytochem.** V. 57, p. 781-785. 2001.

PAVEI C.; KAISER S.; BORRÉ G. L.; ORTEGA G. Validation of a LC method for polyphenols assay in cat's claw (*Uncaria tomentosa*). **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** V. 33, n. 17, p. 1551-1561. 2010.

PAVEI C.; KAISER S.; VERZA S.; BORRÉ G. L.; ORTEGA, G. HPLC-PDA method for quinovic acid glycosides assay in Cat's claw (*Uncaria tomentosa*) associated with UPLC/Q-TOF-MS analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.** V. 25, n. 62, p. 250-257. 2012.

RANTIN, F.; KALININ A.; GLADD M.; FERNANDES M. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **J. Fish Biol.** V.41, p. 805-812. 1992.

SAKAKIBARA, I.; TAKAHASHI, H.; TERABAYASHI, S.; YUZURIHARA, M.; KUBO, M.; ISHIGE, A.; HIGUCHI, M.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; MARUNO, M.; BIGIANG C.; JIANG H. Effect of oxindole alkaloids from the hooks of *Uncaria macrophylla* on thiopental-induced hypnosis. **Phytomed.** V. 5, n. 2, p. 83-86. 1998.

SAKAKIBARA, I.; TERABAYASHI, S.; KUBO, M.; HIGUCHI, M.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; TAKI, K.; KAMEI, J. Effect on locomotion of indole alkaloids from the hooks of *Uncaria* plants. **Phytomed.** V. 6, p. 163-168. 1999.

SANTOS S.; MELLO J. Taninos. In: Simões CMO (org.). Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 615-656. 2007.

SHENG Y.; PERO RW.; WAGNER H. Treatment of chemotherapy induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomed.** V. 7, n. 2, p. 137-143. 2000.

SILVA FILHO, C.; SOUZA, A.; CONCEIÇÃO, M. et al. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Rev. bras. farmacogn.** V. 19, n.4, p. 919-92. 2009.

SMITH V.; BROWN J.; HAUTON C. Immunostimulations in crustaceans, does it really protect against infection?. **Fish. shellfish immun.** V. 15, p. 71-90. 2003.

SORUM H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: AARESTRUP. **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.** p. 213-238. 2006.

VALERIO L.; GONZALES G. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*) : a critical synopsis. **Toxicol Rev.** V. 24, n. 1, p. 11-35. 2005.

WINKALER, E.U.; MACHADO NETO J. G.; MARTINEZ C. B. R. Toxicidade e efeitos do extrato aquoso de folhas secas de nim (*Azadirachta indica*) em parâmetros fisiológicos de tilápias do Nilo. **Anais do ZOOTEC'2005.** 2005.

ZUCKER W. Taninos does structure determine function? An ecological perspective. **Amer. nat.** V. 121, p. 355-365. 1983.

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure – **Acute toxicity test for freshwater fish.** 1985.

MANUSCRITO 2: “Aquaculture” (Amsterdam)

Avaliação temporal da imunomodulação e crescimento de tilápias com dietas suplementadas com *Uncaria tomentosa*

Jefferson Yunis Aguinaga¹, Gustavo S. Claudiano², Paulo F. Marcusso², Marcos Oliveira¹, Thalita Pretillo², Wilson Gómez², Flávio R. de Moraes² e João Kochenborger Fernandes¹.

¹Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

RESUMO

A unha de gato, *Uncaria tomentosa*, é uma planta oriunda da Amazônia com propriedades imunoestimulantes. Neste ensaio, avaliou-se o efeito do tempo de suplementação dietética de ração contendo extrato de unha de gato sobre o crescimento e a resposta inflamatória em *Oreochromis niloticus*. Para tanto, utilizou-se 108 tilápias distribuídas aleatoriamente em 6 caixas de 200L. Os peixes foram alimentados com ração suplementada com 150 mg.Kg⁻¹ do extrato durante três semanas, sendo avaliadas a cada sete dias. Após cada tempo de fornecimento, os animais foram inoculados com *Streptococcus agalactiae* inativado na bexiga natatória e o grupo controle injetado com solução salina 0,65%. No tempo de 24 h pós-desafio, os animais foram eutanasiados e realizado a biometria seguido da coleta do exsudato para contagem total e diferencial do acúmulo de células e coleta de sangue para análise dos parâmetros hematológicos. Verificou-se que os peixes alimentados com o extrato de *U.tomentosa* durante três semanas apresentaram mais crescimento e maior número de leucócitos no local de inflamação, quando submetidos a desafio.

Palavras-chave: Desempenho zootécnico, atividade imune, hematologia, teleósteos.

ABSTRACT

Uncaria tomentosa (cat's claw), is an Amazon rainforest plant with immunostimulant properties. Several studies in animals and humans have demonstrated its efficacy in prevention and treatment of various diseases; however, there are no reports of its properties in fish. In this study, we evaluated the effect of different times of feeding containing cat's claw extract on the performance and the inflammatory response in *Oreochromis niloticus*. Therefore, we used 90 tilapias randomly distributed in 5 200L-tanks. Fish were fed with diets containing 150 mg.Kg⁻¹ of extract for 1, 2 and 3 weeks. At the end, animals were challenged with inactivated *Streptococcus agalactiae* in the swim bladder and the control group was injected with saline 0.65%. At 24h post-challenge, the animals were euthanized and performed biometrics and it was collected exudate to count the total and differential accumulation of cells and blood for analysis of haematological parameters. It was found that the time of supply of 3 weeks is the most suitable, due to the animals supplemented with extract have grown more and more leukocytes at the site of inflammation.

Keywords: Growth performance, immune activity, hematology, teleosts.

INTRODUÇÃO

Os imunoestimulantes são substâncias biológicas que podem incrementar as respostas inespecíficas de defesa dos animais (Vainikka et al., 2005). Dentre os compostos com características imunoestimulantes destacam-se: fatores

nutricionais como as vitaminas, substâncias derivadas de bactérias, polissacarídeos, extratos de plantas e animais, além das substâncias químicas sintéticas (Moraes e Moraes, 2009; Claudiano et al., 2009; Reque et al., 2010; Belo et al., 2012).

Há controversias na literatura quanto ao tempo de suplementação necessária para melhora na homeostase em peixes, na utilização de leveduras (Salvador et al., 2012), vitaminas (Belo et al., 2005) e de fitoterápicos (Eberlin et al., 2005)

A unha de gato (*Uncaria tomentosa*) é uma planta amazônica que pertence à família Rubiaceae, (Andersson e Persson, 1991), comumente usada como planta medicinal pelos incas, tribos amazônicas e até hoje no tratamento de diversas moléstias (Obregon, 1995; Muhammad et al., 2001).

Princípios ativos desta planta, como alcalóides oxindólicos, são encontrados em todas as partes da planta, tendo a maioria atividade imunoestimulante (Pavei et al., 2010). Outros grupos encontrados são os derivados do ácido quinóico e polifenóis de baixo peso molecular com ações antiinflamatórias e antioxidantes (Kepingler et al., 1999; Amaral et al., 2009).

Em ratos, foi demonstrado que o extrato da planta produz aumento de leucócitos no sangue (Sheng et al., 2000a) e de linfócitos esplênicos CD4+, CD8+ e células B em camundongos (Akkesson et al., 2005). A leucopenia induzida por doxorubicina foi revertida após a administração da *U. tomentosa* em ratos (Sheng et al., 2000b). Apesar destes efeitos, há diferenças entre os tempos de fornecimento e/ou aplicação em diversas espécies animais para a utilização do

extrato (Cisneros et al., 2005; Eberlin et al., 2005; Sheng et al., 2000b; Pilarski et al., 2010).

Devido ao exposto acima e a escassez de informações sobre a utilização da unha de gato em peixes, este trabalho objetivou avaliar o melhor tempo de suplementação dietética do extrato de *Uncaria tomentosa* em tilápias do Nilo, desafiadas experimentalmente com *Streptococcus agalactiae*, sobre o crescimento e a resposta imune inata.

MATERIAL E MÉTODOS:

Animais e modelos experimentais

Foram utilizadas 108 tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* ($40,8 \pm 3,2$ g; $10,5 \pm 1,5$ cm), acondicionados ($n=18$) em 6 caixas de fibra (200 L), água de poço artesiano com aeração, alimentadas três vezes ao dia, com ração formulada para a espécie (Tabela 1), conforme Furuya, (2010). A qualidade da água permaneceu na faixa adequada ao conforto dos peixes ($OD= 6.2 \pm 1.1$ mg/L; $T^{\circ}= 24.5 \pm 1.4$ °C; $pH= 7.3 \pm 0.6$ e condutividade elétrica= 102.2 ± 14.4 $\mu S/cm$), e foi monitorada com o uso de uma sonda multiparâmetros, YSI Model MPS 556 (Boyd, 1990).

Para determinar o tempo mais adequado de fornecimento do extrato de unha de gato na ração, foi utilizada a dose 150 mg/Kg (Eberlin et al., 2005). Para tanto, foram avaliados três tempos de fornecimento da ração, que é apresentada na Tabela 1, que foram utilizados anteriormente por Eberlin et al. (2005); Sheng et al. (2000b) e Pilarski et al. (2010), respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1- Ingredientes e composição das dietas experimentais

Ingredientes %	Controle	150 mg/Kg
Farelo de Soja	37,42	37,42
Milho	21,88	21,88
Glúten	12,43	12,43
Farelo de trigo	7,12	7,12
Amido	8,00	8,00
Óleo de soja	4,00	4,00
Casca de arroz	3,72	3,71
Farinha de peixe	2,50	2,50
Fosfato bicálcico	1,47	1,47
Min-peixes	0,50	0,50
Vit-peixes	0,50	0,50
L-treonina	0,23	0,23
DI-metionina	0,14	0,14
BHT	0,05	0,05
Unha-de-gato	0,00	0,0150
L-triptofano	0,05	0,05
TOTAL	100,00	100,00

Composição calculada

Composição química	% de inclusão
Matéria seca	89,63
Proteína bruta	30,14
Proteína digestível	27,5
Energia bruta (kcal/kg)	4100
Fibra bruta	4,81
Material mineral	3,98

1Nos níveis 0,0; 0,0075; 0,0150; 0,0300 e 0,0450% as diferenças foram preenchidas com elemento inerte.
 2 Suplemento vitamínico mineral Rovimix peixe: vit. A: 5000.000 UI; vit. D3: 200.000 UI; vit. E: 5.000 UI; vit. K3: 1000 mg; vit. B1: 1500 mg; vit. B2: 1500 mg; vit. B6: 1500 mg; vit. B12: 4000 mg; vit. C: 15000 mg; ácido fólico: 500 mg; ácido pentotênico: 4000 mg; B.H.T.: 12,25 g; biotina: 50 mg; inositol: 1000 mg; nicotinamida: 7000mg; colina: 40 g; cobalto: 10 mg; cobre: 500 mg; ferro: 5000 mg; iodo 50 mg; manganês: 1500 mg; selênio: 10 mg; zinco: 5000 mg; veículo q. s. q. : 1000 mg.
 BHT: Butil-hidroxi-tolueno

Os peixes foram submetidos a três tratamentos e avaliados durante três semanas, sendo:

- Controle positivo: injetado de *S. agalactiae* inativada + ração comercial;
- Controle negativo: injetado de 0,5 ml de solução de NaCl esterilizada a 0,65% + com 150 mg/Kg de unha de gato;
- Tratamento 150mg/Kg: injetado de *S. agalactiae* inativada + ração com 150 mg/Kg de unha de gato.

Tabela 2 – Distribuição dos peixes

Grupos (número de peixes)	Tempo do experimento			
	7 dias	14 dias	21 dias	Total
Controle positivo	N=6	N=6	N=6	18
Controle negativo	N=6	N=6	N=6	18
Extrato + <i>S. agalactiae</i>	N=6	N=6	N=6	18

Obtenção da bactéria e determinação da CL50

Amostras de *S. agalactiae* foram isoladas de tilápias naturalmente infectadas apresentando sinais clínicos compatíveis com a doença e identificadas segundo Salvador et al. (2005). Realizou-se o sequenciamento do gene 16S rDNA, no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – Crebio, da FCAV/UNESP, adaptado segundo Sebastião et al. (2010), confirmando a cepa de *S. agalactiae*. A determinação dose letal (DL50) seguiu-se recomendações de Salvador et al. (2012), com CL50 determinada em 10^8 UFC/mL.

Material vegetal e extração

Utilizou-se o extrato de casca *U. tomentosa* proveniente do Peru (Casa Massaro®, lote 0442). Este foi moído, secado ao ar e armazenado em sacos de plástico. Para a análise cromatográfica do extrato e preparação da solução mãe foi feita uma solução hidroetanólica a 95% por 5 dias, proporção droga:solvente (1:100, m/v). Em seguida, a solução-mãe foi filtrada (0,14 mm de porosidade Qualy ®). Após o processamento da ração foi incorporado o extrato etílico da *U. tomentosa* (150 mg de extrato por kg de ração). Em seguida, a ração foi submetida a secagem em temperatura ambiente e armazenada para utilização no ensaio.

CLAE-PDA dos alcalóides oxíndoles, derivados do ácido quinóico e polifenóis de baixo peso molecular no material vegetal

O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-PDA) foi utilizado nas análises qualitativas e quantitativas do extrato aquoso da casca de *U. tomentosa*. Para determinar os alcalóides oxíndoles foi empregando o método previamente validado por Kaiser et al., 2013. Utilizou-se uma coluna Gemini-NX RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) (Phenomenex, EUA), protegida por uma precoluna RP-18. A fase móvel consistiu num tampão de acetato de amônio 10 mM (pH 7,0) (A) e acetonitrilo (B) em um programa de gradiente linear, a detecção efetuada a 245 nm; utilizou-se o mitraphyllina (Phytolab, lote 2946, Alemanha) como padrão externo.

Na determinação dos derivados do ácido quinóico utilizou-se coluna Sinergy Fusão RP-18 (150 x 3,9 mm id, 5 µm) (Phenomenex, EUA), protegida por uma precoluna RP-18. A fase móvel foi constituída por ácido fórmico a 0,01% (v/v) (A) e acetonitrilo (B): ácido fórmico 0,01% (90:10, v/v) num programa de gradiente linear, detecção a 245 nm; utilizado o α -hederin (Extrasynthèse, lote 08040314, França) como padrão externo (Pavei et al., 2012).

Os polifenóis de baixo peso molecular, foram analisados em aparelho para CLAE-PDA (Proeminence-Shimadzu, Tóquio, Japão), segundo o método anteriormente validado por Pavei et al., 2010. Foi utilizada uma coluna Gemini RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) (Phenomenex, EUA), protegida por uma precoluna RP-18. A fase móvel consistiu em 0,1% v/v de ácido trifluoroacético (A) e metanol: TFA (99,9:0,1, v/v) (B) em um programa de gradiente linear, detecção efetuada a

325 nm; utilizaram o ácido clorogénico (Fluka, lote 455159/1, Suíça), ácido caféico (Extrasynthèse, lote 0381024, França) e rotina (Sigma, lote 128K1177, EUA) como padrões externos.

Avaliação do crescimento

No início e ao final de cada período experimental foram realizadas as pesagens dos peixes, foram calculados os seguintes parâmetros:

- Ganho de peso dos peixes (GP):

$GP (g) = \text{Peso médio final} - \text{Peso médio inicial}$

- Ganho de peso diário dos peixes (GDP):

$GPD (g) = GP / \text{número de dias do experimento}$

- Conversão alimentar aparente (CA):

$CA: \text{Alimento consumido (g)} / \text{ganho de peso (g)}$

- Biomassa final (BF):

$BF (g) = \text{Peso médio final (g)} \times \text{Número de peixes analisados}$

Indução da Aerocistite por *Streptococcus agalactiae* inativado

Após os períodos de suplementação, os animais foram anestesiados com benzocaína (1g/10L) para a aplicação do estímulo lesivo na bexiga natatória anterior. Os animais foram novamente agrupados em delineamento inteiramente casualizado, em dois grupos para a indução da inflamação, onde, um grupo recebeu 0,5 mL de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65% (grupo controle negativo) e os outros grupos receberam o mesmo volume dessa solução, contendo 3×10^8 UFC de *S. agalactiae*, inativada pelo calor (banho-maria a 40° C,

por 30 minutos). Após a indução do processo inflamatório, os animais foram novamente banhados em solução de cloreto de sódio, como anteriormente descrito.

Efeito da aerocistite

Após os períodos de suplementação, os animais foram desafiados, conforme descrito acima, e no tempo pré-determinado de 24 HPE (horas pós-estímulo), os peixes foram mortos por aprofundamento do plano anestésico em solução de benzocaína (1:20 000) diluída em álcool 98° (0,1 g/mL) (Wedemeyer, 1970). A seguir foi coletado sangue por punção do vaso caudal de cada peixe, obtendo 0,5 mL de sangue com EDTA 10% para realização da contagem de eritrócitos e leucócitos e hematócrito (Goldenfarb et al., 1971). A partir das amostras sanguíneas, as extensões foram confeccionadas segundo Tavares-Dias e Moraes (2006).

Para a contagem total e diferencial das células acumuladas no foco inflamado, a bexiga natatória foi lavada com 0,5 ml de PBS, com EDTA a 0,09% e o exsudato recolhido, e utilizando-se os procedimentos descritos por Martins et al. (2009) e colorações segundo Tavares-Dias & Moraes, (2007).

Análise estatística

A determinação quantitativa das áreas dos picos nos cromatogramas foi realizada utilizando as equações de regressão do ácido clorogénico (CLA), ácido cafeínico (CFA), e as curvas de calibração de rotina (RUT) (Pavei et al., 2012).

Os cálculos dos níveis de alcalóides oxindólicos (AO), derivados do ácido quinóvico (DAQ) e polifenóis de baixo peso molecular (PBM) foram realizados utilizando a equação: $A = \frac{1}{2} h \cdot W_b$, para calcular a área de um pico (Pavei et al, 2010). O delineamento experimental foi realizado em DIC.

Os demais resultados foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (programa SAS 8.0), ao nível de significância de 5% (Snedecor & Cochran, 1974).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de cromatografia CLAE-PDA do extrato etílico (95%) da casca de *U. tomentosa* revelou três compostos característicos desta planta, confirmando assim, a identidade da amostra. Estes compostos foram alcalóides oxindólicos (AO), os quais foram os mais concentrados ($28,07 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$), seguido pelos polifenóis de baixo peso molecular (PMB) ($15,96 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$) e em menor concentração os derivados de ácido quinóvico (DAQ) com media total de $3,94 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ (Figura 1).

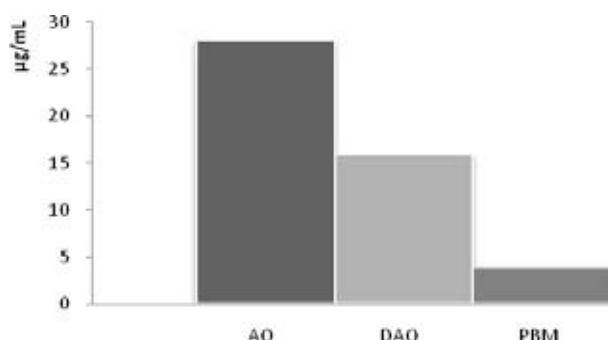


Figura 1. Concentrações de derivados de alcalóides oxindólicos (AO), derivados do ácido quinóvico (DAQ) e polifenóis de baixo peso molecular (PBM) presentes no extrato aquoso de *U. tomentosa*. Os resultados estão expressos com média \pm desvio-padrão.

Os componentes químicos identificados corroboram os encontrados na literatura sobre a planta (Aquino et al., 1989; Keplinger et al., 1999; Bors et al., 2012). Estes achados são importantes para a autenticidade e qualidade do extrato usado no estudo, uma vez que há grande variação na quantidade dos compostos ativos das plantas e os efeitos dos fitoterápicos são decorrentes dos seus metabolitos secundários isolados ou à sua ação sinérgica (Simões et al., 2010).

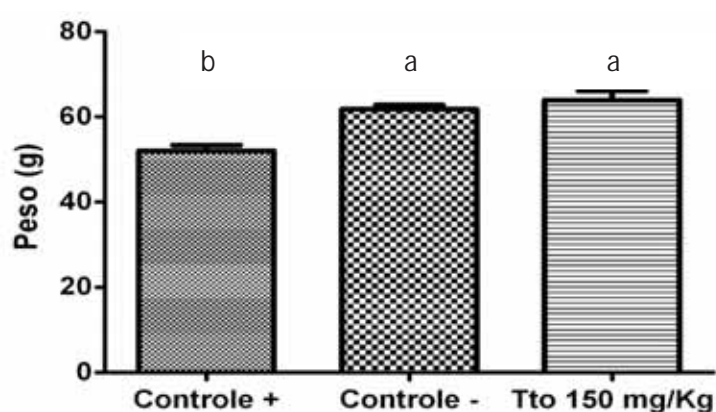


Figura 2. Efeito da suplementação da unha de gato na ração sobre o peso final nas tilápias (três semanas). Os resultados estão expressos com a média \pm erro-padrão (N=18). Letras diferentes significam diferenças significativa nos tratamentos.

Na avaliação do desempenho zootécnico, observou-se que o efeito da suplementação da unha de gato melhorou o peso dos animais após três semanas de fornecimento, sendo que nas primeiras duas semanas não se obteve diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$), o que pode ser observado na Figura 2 e Tabela 3.

Tabela 3- Efeito da suplementação do extrato alcoólico de unha de gato na ração sobre o peso final das tilápias

	1 semana		2 semanas		3 semanas				
Controle -	41,05	\pm 3,67	a	49,82	\pm 2,51	a	61,78	\pm 1,02	A
Controle +	39,11	\pm 1,89	a	46,30	\pm 2,90	a	52,02	\pm 1,34	B
Tto 150 mg/Kg	41,93	\pm 2,14	a	51,87	\pm 3,04	a	64,23	\pm 2,44	A

¹ Médias (n=18) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

² As letras comparam na coluna os diferentes tratamentos.

Tabela 4- Valores médios e respectivos erros-padrão dos parâmetros zootécnicos após três semanas de suplementação com unha de gato

	Controle -	Controle +	Tto 150
Peso final (g)	61,78 ± 1,02 a	52,02 ± 1,34 b	64,23 ± 2,44 a
Biomassa Final (g)	1112,04 ± 38,3 a	936,36 ± 45,1 b	1156,14 ± 49,4 a
Sobrevivência (%)	100,00 a	100,00 a	100,00 a
Peso inicial (g)	34,76 ± 3,30 a	32,65 ± 3,51 a	34,07 ± 3,21 a
Ganho de peso (g)	27,02 ± 2,28 a	19,37 ± 2,17 b	30,16 ± 0,77 a
Ganho de peso diário (g)	1,29 ± 0,11 a	0,92 ± 0,10 b	1,44 ± 0,04 a
Conversão alimentar	1,85 a	2,58 b	1,66 a

¹Médias (n=18) na mesma linha, seguidas por letras diferentes diferem entre si (P>0,05) pelo teste de Tukey.

Neste estudo, foi observado o incremento de diferentes parâmetros do desempenho zootécnico (ganho de peso, ganho de peso diário e conversão alimentar aparente) nos animais suplementados com unha de gato após 21 dias (tabela 4), sendo a primeira vez que se reporta aumento nestes parâmetros com o uso desta planta em peixes.

A unha de gato foi testada *in vivo* em humanos (Kepingler et al., 1999), bois (Bednarek et al. 2002) e roedores (Cisneros et al.; 2005; Eberlin et al., 2005; Nogueira et al., 2010), sendo que os parâmetros zootécnicos não foram considerados ou o tempo de fornecimento foi muito curto para observar a influência da planta sobre o desempenho nestes animais. No entanto, nestes trabalhos foram relatados aumento em alguns parâmetros com consequente melhora na homeostasia, o que pode justificar o aumento do desempenho zootécnico das tilápias após três semanas.

O incremento do desempenho zootécnico em peixes com uso de extrato de diversas plantas já foi relatado em outros estudos, como o extrato de poli-ervas

“ImmunoPlus” em *Labeo rohita* suplementados durante 10; 30 e 45 dias, com incremento no peso final em todos os tempos avaliados (Kumari et al., 2007).

A contagem de células (hemácias e leucócitos) no sangue periférico (terceira semana) está expressa nas Figuras 3 e 4, revelando que não houve diferença entre os tratamentos.

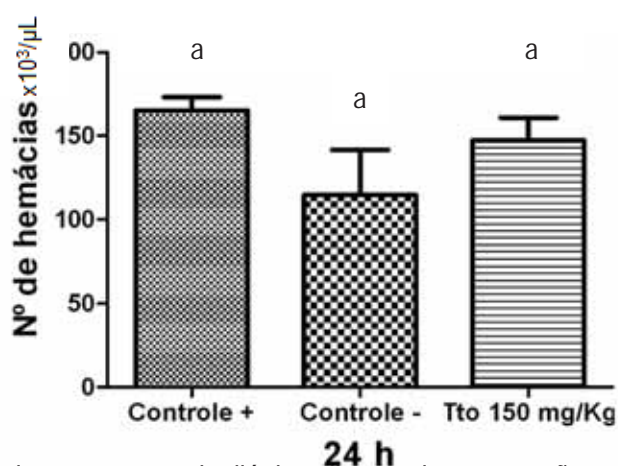


Figura 3. Nº de hemácias em sangue de tilápias alimentadas com ração suplementada com extrato de unha de gato durante três semanas. Os resultados estão expressos com a média \pm erro-padrão (N=6), letras iguais significa que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

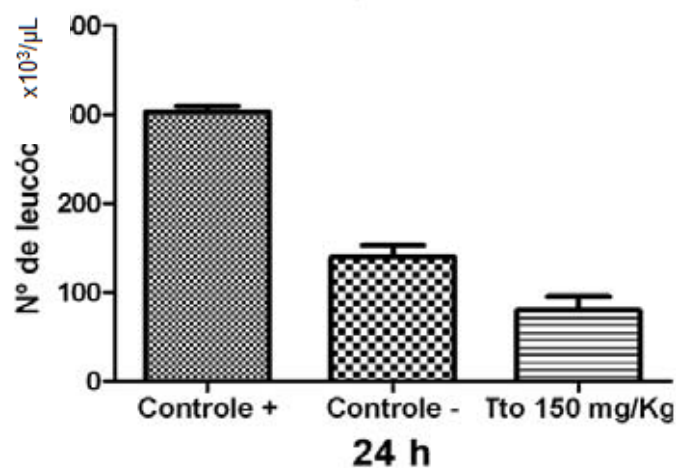


Figura 4. Nº de leucócitos em sangue de tilápias alimentadas com ração suplementada com extrato de unha de gato durante três semanas. Os resultados estão expressos com a média \pm erro-padrão (N=6), letras diferentes significam diferenças significativa entre os tratamentos.

O número de leucócitos apresentou diferença na primeira semana, entre o grupo controle negativo e os grupos controle positivo e Tto 150 mg/Kg. Na

segunda semana verificou-se diferença ($P < 0,05$) entre os três grupos, com o grupo suplementado com 150 mg/Kg do extrato apresentando maiores valores em relação aos outros grupos (Tabela 5). Ainda na análise da mesma tabela na terceira semana, o grupo controle positivo foi significativamente maior que o grupo controle negativo e este, foi maior ($P < 0,05$) que o grupo Tto 150 mg/Kg.

Tabela 5- Valores médios¹ e respectivos erros-padrão análise do número de leucócitos em sangue ($\times 10^3/\mu\text{L}$)

Tratamento	Semana								
	1			2			3		
Controle +	284,27	± 35,4	Aab	250,31	± 12,38	Ba	305,39	± 17,42	Ab
Controle -	121,33	± 31,87	Ba	112,45	± 28,01	Ca	136,12	± 35,62	Ba
150 mg/Kg	292,75	± 39,3	Aa	385,07	± 42,3	Ab	75,9	± 39,1	Cc

¹ Médias (N=6) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada tempo de avaliação, enquanto as letras minúsculas comparam na linha o número de leucócitos em sangue periférico entre cada tratamento.

Foram encontrados resultados variáveis no número de leucócitos em sangue, na primeira semana não houve influencia do tratamento nos resultados devido provavelmente ao pouco tempo de suplementação com a planta, estes achados são compatíveis com os encontrados por Eberlin et al. (2005) em ratos suplementados, durante uma semana, via oral.

Já na segunda semana observou-se incremento no número de leucócitos em sangue no tratamento 150 mg/Kg o que corrobora os achados de Sheng et al. (2000b), que após administrar em solução contendo *U.tomentosa* em camundongos observaram reversão de leucopenia induzida com doxorubicina. Akesson et al. (2003) observaram que camundongos suplementados com solução comercial de unha de gato apresentaram maior número de leucócitos circulantes.

Na terceira semana observou-se uma grande diminuição no número de leucócitos em sangue periférica no grupo suplementado com 150 mg/Kg, devido provavelmente ao esgotamento da mobilização do *pool* marginal e/ou a migração dos leucócitos circulantes para o focoinflamatório, resultados que se assemelham aos achados por Pilarski et al. (2010), em camundongos, após 21 dias de suplementação com o mesmo extrato.

No caso do hematócrito, não houve diferença entre os tratamentos em nenhum dos tempos avaliados (Tabela 6).

Tabela 6- Valores médios e respectivos erros-padrão do hematócrito (%)

	semana 1		semana 2		semana 3	
Controle -	36,00	± 1,16	29,69	± 2,61	42,00	± 1,73
Controle +	29,00	± 1,45	32,20	± 1,59	38,80	± 1,59
Tto 150 mg/Kg	31,33	± 2,14	31,13	± 3,61	39,60	± 1,27

Como observado nas Tabelas supracitadas, o número de hemácias e do hematócrito não diferiu entre os tratamentos ($P < 0,05$), resultado relatado previamente em ratos suplementados com o extrato após 21 dias (Pilarski et al., 2010). Bednarek et al. (2004) também observaram a não influência da suplementação com o extrato no número de eritrócitos em bezerros.

A contagem de células totais no exsudato inflamatório das tilápias desafiadas com a bactéria (controle positivo e Tto 150 mg/Kg) revelou aumento significativo no número de células em relação ao grupo controle negativo ($P < 0,05$) na terceira semana (Figura 5).

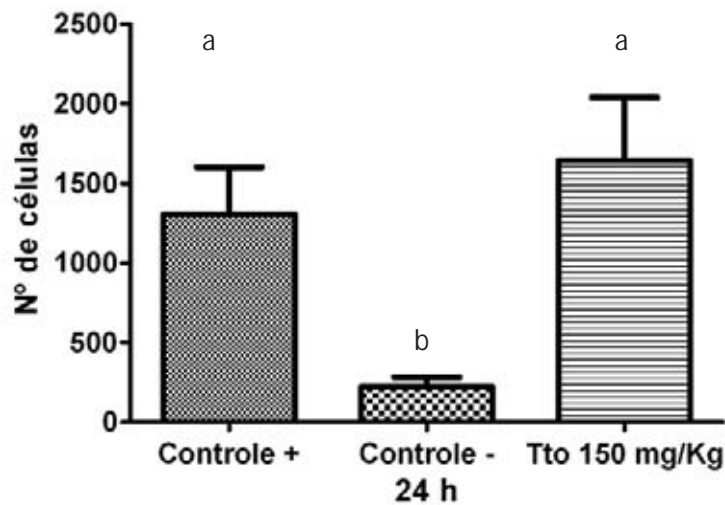


Figura 5. Efeito do extrato alcoólico de unha de gato na ração sobre a contagem e células totais (3 semanas). Os resultados estão expressos com a média \pm erro-padrão (N=6), letras diferentes significam diferenças significativa entre os tratamentos.

Os resultados do exsudato inflamatório mostraram que apesar do tratamento 150 mg/Kg ser maior que o controle positivo em todos os tempos avaliados, não houve diferença significativa, o que pode ser explicado devido ao curto tempo de suplementação (1; 2 e 3 semanas), ao curto tempo de avaliação após desafio (24 horas) ou à grande diferença entre as respostas imunes dos indivíduos, o que provoca um grande desvio padrão e como conseqüência a não diferença entre eles.

Os resultados deste trabalho mostram a primeira evidência do efeito desta planta sobre o desempenho zootécnico em animais, particularmente em peixes. Por outro lado a influência da unha de gato sobre os leucócitos mostra discrepâncias com alguns trabalhos achados na literatura o que pode ser devido à quantidade e disponibilidade dos compostos químicos da planta na ração e ao fato

do estudo ser realizado com uma espécie não mamífera. Entretanto, é necessário maiores estudos para elucidar os mecanismos de ação em peixes.

Concluí-se que o uso de 150 mg/Kg de *Uncaria tomentosa* na ração de tilapia nilótica durante 21 dias incrementa o desempenho zootécnico e mantém alta a quantidade de leucócitos no local da inflamação. Adicionalmente, foi constatado que o uso desta planta via oral, na concentração testada, é seguro em peixes, não mostrando em nenhum dos casos mortalidade ou sinais clínicos de intoxicação, o qual abre a possibilidade do uso em aplicações clínicas, sendo necessário maiores estudos para elucidar os mecanismos de ação em peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÅKESSON C.; LINDGREN H.; PERO R.; LEANDERSON T.; IVARS F. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF-[kappa]B activity without inducing cell death. **Int. Immunopharmacol.** V. 3, p. 1889–1900. 2003.

ÅKESSON C.; LINDGREN H.; PERO R.; LEANDERSON T.; IVARS F. Quinic acid is a biologically active component of *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100R. **Int. Immunopharmacol.** 5, p. 219-229, 2005.

AMARAL S.; MIRA L.; NOGUEIRA J.; SILVA A.; FLORÊNCIO M. Plant Extracts with Anti-inflammatory Properties – A New Approach for Characterization of their Bioactive Compounds and Establishment of Structure - Antioxidant Activity Relationships. **Bioorg. Medicinal Chem.** V. 17, p. 1876-1883. 2009.

ANDERSSON L.; PERSSON C. Circumscription of the tribe Cinchoneae (Rubiaceae) – A cladistic approach. **Pl. Syst. Evol.** 178, p. 65–94, 1991.

AQUINO R.; DE SIMONE F.; PIZZA C.; CONTI C.; STEIN M. Plant metabolites, Structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. **J. Nat. Prod.** V. 52, p. 679–685, 1989.

BEDNAREK D., ŁUKASIAK J., KONDRACKI M., ŻUROWSKA K, FALKIEWICZ B.; NIEMCZUK K. Modulating effects of *Uncaria tomentosa* in experimentally-induced local pneumonia in calves **Bull. Vet. Inst. Pulawy.** V. 46, p. 65-77. 2002.

BEDNAREK D., ŁUKASIAK J., KONDRACKI M., ŻUROWSKA K, FALKIEWICZ B.; NIEMCZUK K. Analysis of phenotype and functions of peripheral blood leukocytes in cellular immunity of calves treated with *Uncaria tomentosa*. **Vet. Inst. Pulawy.** V. 48, p. 289-296. 2004.

BELO M.; SCHALCH S.; MORAES F.; SOARES V.; OTOBONI A.; MORAES J. Effect of Dietary Supplementation with Vitamin E and Stocking Density on Macrophage Recruitment and Giant Cell Formation in the Teleost Fish, *Piaractus mesopotamicus*. **J Comp Path.** V. 133, p. 146-154. 2005.

BELO M.; MORAES J.; SOARES V.; MARTINS M.; BRUM C.; MORAES F. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacu. **Pesqui Agropecu Bras.** V. 47, p. 1015-1021. 2012.

BORS M.; SICIŃSKA P.; MICHAŁOWICZ J.; WIETESKA P.; GULEWICZ K.; BUKOWSKA B. Evaluation of the effect of *Uncaria tomentosa* extracts on the size and shape of human erythrocytes (*in vitro*). **Environ Toxicol Pharmacol.** V. 33, p 127-134. 2012.

CISNEROS F.; JAYO M.; NIEDZIEL L. An *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation. **J Ethnopharmacol.** V. 96, p. 355–364. 2005.

CLAUDIANO G.; DIAS NETO J.; SAKABE R. et al. Eficácia do extrato aquoso de "*Terminalia catappa*" em juvenis de tambaqui parasitados por monogénéticos e protozoários. **Rev. Bras. Saúde Prod Anim.** V. 10, n. 3, p. 625-636, 2009.

EBERLIN S.; DOS SANTOS L.; QUEIROZ M. *Uncaria tomentosa* extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Int Immunopharmacol.** V. 5, n 7-8, p.1235-1246. 2005.

FURUYA W. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias.** 100p. 2010.

GOLDENFARB P.; BOWYER F.; HALL E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Am J Clin Pathol.** V.56, p. 35-39 1971.

HEMINGWAY S.; PHILLIPSON J. Alkaloids from S. American species of *Uncaria* (Rubiaceae). **J. Pharm. Pharmacol.** p. 113. 1974.

KAISER S.; VERZA S.; MORAES R.; DE RESENDE P.; BARRETO F.; PAVEI C.; ORTEGA G. Cat's claw oxindole alkaloid isomerization induced by common extraction methods. **Química Nova.** 2013, (artigo aceito).

KEPLINGER K.; LAUS G.; WURM M.; DIERICH M.; TEPPNER H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.—Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **J. ethnopharmacol.** V. 64, p. 23–34. 1999.

KUMARI J.; SAHOO P.; GIRI S. Effects of polyherbal formulation "Immunoplus" on immunity and disease resistance of Indian major carp, *Labeo rohita* at different stages of growth. **Indian J Exp Biol.** V. 45, p 291-298. 2007.

MARTINS M.; VIEIRA F.; JERÔNIMO G.; MOURIÑO J.; DOTTA G.; SPECK G.; JATOBÁ A.; PEDROTTI F.; BUGLIONE-NETO C.; PEREIRA G. Leukocyte

response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Fish Physiol Biochem.** V.35, p. 219-222. 2009.

MORAES F.; MORAES J. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo.** Macapá: Embrapa. p. 625-723. 2009.

MUHAMMAD I.; DUNBAR D.; KHAN R.; GANZERA M.; KHAN I. Investigation of Uña de Gato 17-deoxyloganic acid and ¹⁵N NMR spectroscopic studies on pentacyclindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Phytochem.** V. 57, p. 781-785. 2001.

NOGUEIRA J.; MOTA T.; CARNEIRO G.; CARVALHO L.; PORTELA A.; MANUEL B.; SCHOR E. Experimental endometriosis reduction in rats treated with *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract. **Eur J Obstet Gyn R B.** 2010.

OBREGON L. Cat's Claw, Genus *Uncaria*. Botanical, Chemical and Pharmacological studies of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.(Rubiaceae) and *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. **Institute of American Phytotherapy**, Lima, Peru. 1995.

PAVEI C.; KAISER S.; BORRÉ G. L.; ORTEGA G. Validation of a LC method for polyphenols assay in cat's claw (*Uncaria tomentosa*). **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** V. 33, n. 17, p. 1551-1561. 2010.

PAVEI C.; KAISER S.; VERZA S.; BORRÉ G. L.; ORTEGA, G. HPLC-PDA method for quinovic acid glycosides assay in Cat's claw (*Uncaria tomentosa*) associated with UPLC/Q-TOF-MS analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.** V. 25, n. 62, p. 250-257. 2012.

PILARSKI R.; FILIP B.; WIETRZYK J.; KURÁS M.; GULEWICZ K. Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. **Phytomed.** V. 17, p. 1133–1139. 2010.

REQUE, V.R.; MORAES, J.R.E., BELO, M.A.A., MORAES, F.R. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquacult.** V. 300, p. 37– 42. 2010.

SALVADOR R.; MULLER E.; FREITAS J. et al. Isolation and characterization of *Streptococcus spp* group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Cienc. Rural.** V. 35, p. 1374-1378. 2005

SALVADOR R.; TOAZZA C.; MORAES J.; MORAES F. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Dis Aquat Org.** V. 98, n. 3, p 235-241. 2012.

SEBASTIÃO F.; PILARSKI F.; LEMOS M. Molecular characterization of *flavobacterium columnare* isolates from Nile tilapia and piracanjuba by RAPD-PCR. **Bol Inst Pesca.** V. 36, n.4, p 325 – 331. 2010.

SHENG Y.; BRYNGELSSON C.; PERO R. Enhance DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-Med-100k, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **J Ethnopharmacol.** V. 96, p. 577-584. 2000a.

SHENG Y.; PERO RW.; WAGNER H. Treatment of chemotherapy induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomed.** V. 7, n. 2, p. 137-143. 2000b.

SIMOES C.; ROS P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Ed. 6, n 1104.

SNEDECOR G.; COCHRAN W. **Statistical methods**. 7.ed. Ames, Iowa State University. 507p. 1974.

TAVARES-DIAS M.; MORAES F. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes, Characidae) intensively bred. **Hidrobiol.** V.16, p. 271-274. 2006.

TAVARES-DIAS M.; MORAES F. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. **J Fish Biol.** V.71, p. 383-388. 2007.

VAINIKKA A.; JOKINEN E.; KORTET R.; PAUKKU S. PIRHONEN J.; RANTALA M.; TASKINEN J. Effects of testosterone and B-glucan on immune function in tench. **J. Fish Biol.** V. 66, p. 348–361. 2005.

WEDEMEYER G. Stress of anaesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout. **J Fish Res Board Can.** V.27, p. 909-914. 1970.

MANUSCRITO 3: “Fish and Shellfish Immunology”

Efeito do extrato de *Uncaria tomentosa* no desempenho zootécnico e na atividade imune de *Oreochromis niloticus* desafiadas com *Streptococcus agalactiae*

Jefferson Yunis Aguinaga¹, Gustavo S. Claudiano², Paulo F. Marcusso², Marcos Oliveira¹, Thalita Pretillo², Wilson Gómez², Flávio R. de Moraes² e João B. Kochenberger Fernandes¹.

¹Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

RESUMO

A unha de gato, *Uncaria tomentosa*, é uma planta oriunda da Amazônia com propriedades imunoestimulantes. Para avaliar o efeito da unha de gato sobre o crescimento e atividade imune, foram distribuídas aleatoriamente 450 tilápias (81,3 ± 4,5g), em 18 tanques (1500 litros). Os peixes foram alimentados durante três semanas com dietas contendo extrato de unha de gato: 0; 75; 150; 300 e 450 mg/kg da ração, com três repetições. Após as três semanas, os peixes foram desafiados com *Streptococcus agalactiae* inativado e nos tempos de 6; 24 e 48 horas após desafio (HPD) foram tomadas as amostras. Verificou-se aumento no número de leucócitos, dependente de dose, às 6 HPD em sangue e um grande incremento às 24 HPD de leucócitos no local da inflamação. No baço, os centros melanomacrófagos foram maiores em tamanho e número nos grupos suplementados. Observou-se incremento da expressão de IgM no baço 24 HPD nos grupos 300 e 450 mg/Kg. Não houve alterações histopatológicas em brânquias, intestino, baço e fígado. Verificou-se aumento no ganho de peso e

conversão alimentar, que pode ser explicado parcialmente pelo incremento no tamanho dos vilos intestinais. Finalmente, os resultados são a primeira evidência do efeito da *U. tomentosa* no ganho de peso e ativação do sistema imune inato e específico. Adicionalmente, os resultados histopatológicos sugerem que a planta pode-se ser usada oralmente em peixes sem efeitos colaterais indesejáveis.

Palavras-chave: Desempenho zootécnico, atividade imune, hematologia, teleósteos

ABSTRACT

Uncaria tomentosa (cat's claw), is a plant originated from Amazon rainforest with immunostimulant properties. To evaluate the effect of this plant on immune activity and growth performance of Nile tilapia, we used 450 fish ($81,3 \pm 4,5g$) randomly distributed at 25 fish per 1500-L tank and fed a diet containing 0.0, 75, 150, 300 and 450 mg "uña de gato"/kg diet for 3 weeks. It was used three replicates per treatment and control groups. After the 3-week experimental period, fish of each treatment were challenged by inactivated *Streptococcus agalactiae*. Samples were taken at 6, 24 and 48 hours after the inflammatory stimulus. We found a dose-dependent increase in blood leukocytes after 6 hours post-inoculation and a large dose-dependent increased of leukocytes at site of inflammation at 24 hours post-inoculation. Further, splenic melano-macrophage centers were significant higher in size and number in treated groups. Furthermore, a significant increase of IgM expression in spleen was detected at 24 hours post-bacterial challenge in supplemented fish with 300 and 450 mg *U. tomentosa*/Kg diet. There were no histopathological changes in any treatment in gills, intestine, spleen and liver, even

there was no expression of iNOX in liver, confirming the absence of injury in this organ. We found an unexpected increase of weight gain and feed conversion that would be explained, partially, due to increase of intestinal villus size. Finally, the reported results provide the first evidence that *Uncaria tomentosa* added to Nile tilapia diet, particularly 300 mg/kg feed for 3 weeks, activates non-specific immunity, growth as well as specific immune response. Additionally, histopathological results suggest that the plant could be used orally without undesirable side effects.

Keywords: Growth performance, immune activity, hematology, teleosts.

INTRODUÇÃO

Os imunoestimulantes são substâncias que podem incrementar as respostas inespecíficas de defesa dos animais (Vainikka et al., 2005). Dentre os compostos com características imunoestimulantes destacam-se: fatores nutricionais como as vitaminas, substâncias derivadas de bactérias, polissacarídeos, extratos de plantas e animais, além das substâncias químicas sintéticas (Moraes e Moraes, 2009; Claudiano et al., 2009; Reque et al., 2010; Belo et al., 2012).

A *Uncaria tomentosa* é uma planta amazônica e pertence à família Rubiaceae (Andersson & Persson, 1991), popularmente conhecida como “unha de gato”. Comumente usada como planta medicinal pelos incas, tribos amazônicas e até hoje no tratamento de diversas moléstias (Obregon, 1995; Muhammad et al., 2001). São reconhecidos princípios ativos desta planta, como alcalóides oxindólicos, encontrados em todas as partes da planta, tendo a maioria destas

atividades imunoestimulante. Outros grupos encontrados são os derivados do ácido quinóico e polifenóis de baixo peso molecular com ações antiinflamatórias e antioxidantes (Kepingler et al., 1999; Amaral et al., 2009; Pavei et al. 2010).

Experimentos *in vivo* demonstraram que o extrato da planta produz aumento de leucócitos no sangue em ratos (Sheng et al., 2000a) e de linfócitos esplênicos CD4+, CD8+ e células B em camundongos (Akkesson et al., 2005). A leucopenia induzida por doxorubicina em ratos foi revertida após a administração da *Uncaria tomentosa* (Sheng et al., 2000b).

Eberlin et al. (2005) demonstraram que o extrato de *Uncaria tomentosa* protege os ratos de uma dose letal de *Listeria monocytogenes*, com elevação da taxa de sobrevivência superior a 35%, devido ao aumento do número de células progenitoras de granulócitos-macrófagos na medula óssea. Estudos *in vitro* demonstraram as propriedades antibacterianas da *U. tomentosa* frente a *Bacillus sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Kloucek et al., 2005).

Apesar de existirem alguns estudos sobre as qualidades imunoestimulantes do extrato de *Uncaria tomentosa*, não se conhecem os efeitos na aquicultura, sobretudo na resistência dos peixes às doenças mais comuns. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito da suplementação dietética do extrato de *Uncaria tomentosa* em tilápias do Nilo desafiadas experimentalmente com *Streptococcus agalactiae* sobre a eficiência produtiva e a resposta imune inata.

MATERIAL E MÉTODOS:

Animais e modelos experimentais

Foram utilizados 450 tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* ($81,3 \pm 4,5$ g; $13,5 \pm 1,5$ cm), acondicionados (n=25) em 18 tanques (1500 L), água de nascente, vazão de 6 L/min, alimentadas três vezes ao dia, com ração formulada para a espécie (Furuya, 2010) (Tabela 1). A qualidade da água permaneceu na faixa adequada ao conforto dos peixes (OD= $6,8 \pm 0,9$ mg/L; $T^{\circ} = 25,47 \pm 2,1$ °C; pH= $7,4 \pm 0,8$ e condutividade elétrica = $128,96 \pm 19,6$ μ S/cm), e foi monitorada com uma sonda multiparâmetros

Os peixes foram alimentados três vezes ao dia durante três semanas com ração formulada para atender as exigências da tilápia do Nilo (Tabela 1), conforme Furuya (2010). Para a avaliação das doses crescentes do extrato da planta na ração, foram utilizadas doses menores e maiores daquelas empregadas por Eberlin et al. (2005) em ratos (150 mg/Kg), 0; 75; 150; 300 e 450 mg/kg da ração (Tabela 2). Cada tratamento foi constituído de três repetições (tanques de 1500L) contendo cada um, 25 peixes.

Tabela 1 - Ingredientes e composição das dietas experimentais

Ingredientes %	Controle	75 mg/Kg	150 mg/Kg	300 mg/Kg	450 mg/Kg
Farelo de Soja	37,42	37,42	37,42	37,42	37,42
Milho	21,88	21,88	21,88	21,88	21,88
Glúten	12,43	12,43	12,43	12,43	12,43
Farelo de trigo	7,12	7,12	7,12	7,12	7,12
Amido	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Óleo de soja	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Casca de arroz	3,72	3,71	3,71	3,69	3,68
Farinha de peixe	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Fosfato bicálcico	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47
Min-peixes	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Vit-peixes	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
L-treonina	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
DL-metionina	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
BHT	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Unha-de-gato	0,00	0,0075	0,0150	0,0300	0,0450
L-triptofano	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Composição calculada

Composição química	% de inclusão
Matéria seca	89,63
Proteína bruta	30,14
Proteína digestível	27,5
Energia bruta (kcal/kg)	4100
Fibra bruta	4,81
Material mineral	3,98

1Nos níveis 0,0; 0,0075; 0,0150; 0,0300 e 0,0450% as diferenças foram preenchidas com elemento inerte.
 2 Suplemento vitamínico mineral Rovimix peixe: vit. A: 5000.000 UI; vit. D3: 200.000 UI; vit. E: 5.000 UI; vit. K3: 1000 mg; vit. B1: 1500 mg; vit. B2: 1500 mg; vit. B6: 1500 mg; vit. B12: 4000 mg; vit. C: 15000 mg; ácido fólico: 500 mg; ácido pentotênico: 4000 mg; B.H.T.: 12,25 g; biotina: 50 mg; inositol: 1000 mg; nicotinamida: 7000mg; colina: 40 g; cobalto: 10 mg; cobre: 500 mg; ferro: 5000 mg; iodo 50 mg; manganês: 1500 mg; selênio: 10 mg; zinco: 5000 mg; veículo q. s. q. : 1000 mg.

BHT: Butil-hidroxi-tolueno

Controle positivo – injetado de *Streptococcus agalactiae* inativada + ração comercial sem extrato da planta – controle positivo;

Controle negativo – injetado de 0,5 ml de solução de NaCl esterilizada a 0,65% + ração comercial sem extrato da planta - controle negativo;

75 mg/Kg – injetado de *Streptococcus agalactiae* inativada + ração com 75 mg/Kg de unha de gato;

150 mg/Kg – injetado de *Streptococcus agalactiae* inativada + ração com 150 mg/Kg de unha de gato;

300 mg/Kg – injetado de *Streptococcus agalactiae* inativada + ração com 300 mg/Kg de unha de gato;
 450 mg/Kg – injetado de *Streptococcus agalactiae* inativada + ração com 450 mg/Kg de unha de gato.

Tabela 2: Delineamento do experimento

Grupos (número de peixes)	Horas de sacrifício pós-estímulo			
	6	24	48	Total
Controle positivo	N=7	N=7	N=7	N=21
Controle negativo	N=7	N=7	N=7	N=21
75 mg/Kg extrato + <i>S. agalactiae</i>	N=7	N=7	N=7	N=21
150 mg/Kg extrato + <i>S. agalactiae</i>	N=7	N=7	N=7	N=21
300 mg/Kg extrato + <i>S. agalactiae</i>	N=7	N=7	N=7	N=21
450 mg/Kg extrato + <i>S. agalactiae</i>	N=7	N=7	N=7	N=21

Obtenção da bactéria e determinação da CL50

Amostras de *S. agalactiae* foram isoladas de tilápias naturalmente infectadas apresentando sinais clínicos compatíveis com a doença e identificação segundo Salvador et al. (2005). Realizou-se o sequenciamento do gene 16S rDNA, no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica Crebio da UNESP/FCAV, adaptado segundo Sebastião et al. (2010), confirmando a cepa de *S. agalactiae*. A determinação dose letal (DL50) seguiu-se recomendações de Salvador et al. (2012), com CL50 determinada em 10^8 UFC/mL.

Material vegetal e extração

Utilizou-se o extrato de casca *U. tomentosa* proveniente do Peru (Casa Massaro®, lote 0442). Este foi moído, secado ao ar e armazenado em sacos de plástico. Na análise cromatográfica do extrato foi feita uma solução hidroetanólica

a 95% por 5 dias, proporção droga:solvente (1:100, m/v). Para preparação da solução-mãe que foi adicionada na ração, preparou-se uma solução hidroetanólica a 95% durante 5 dias (10mg/ml). Em seguida, a solução-mãe foi filtrada (0,14 mm de porosidade Qualy ®). A tabela 1 expressa a composição percentual e químico-bromatológica da ração basal (30,1% de proteína bruta e 4100 kcal energia bruta). Após a extrusão da ração foi incorporado o extrato etílico da *U. tomentosa* (150 mg de extrato por kg de ração). Em seguida, a ração foi submetida a secagem em temperatura ambiente e armazenada para utilização no ensaio.

CLAE-PDA dos alcalóides oxíndoles, derivados do ácido quinóvico e polifenóis de baixo peso molecular no material vegetal

O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-PDA) foi utilizado nas análises qualificativas e quantitativas do extrato aquoso do caule de *U. tomentosa*. Para determina os alcalóides oxíndoles foi empregando o método previamente validado por Kaiser et al., 2013. Utilizou-se uma coluna Gemini-NX RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 um) (Phenomenex, EUA), protegida por uma precoluna RP-18. A fase móvel consistiu num tampão de acetato de amônio 10 mM (pH 7,0) (A) e acetonitrilo (B) em um programa de gradiente linear, a detecção efetuada a 245 nm; utilizou-se o mitraphyllina (Phytolab, lote 2946, Alemanha) como padrão externo.

Na determinação dos derivados do ácido quinóvico utilizou-se coluna Sinergy Fusão RP-18 (150 x 3,9 mm id, 5 um) (Phenomenex, EUA), protegida por uma precoluna RP-18. A fase móvel foi constituída por ácido fórmico a 0,01% (v/v)

(A) e acetonitrilo (B): ácido fórmico 0,01% (90:10, v/v) num programa de gradiente linear, detecção a 245 nm; utilizado o α -hederin (Extrasynthèse, lote 08040314, França) como padrão externo (Pavei et al., 2012).

Os polifenóis de baixo peso molecular, foram analisados em aparelho para CLAE-PDA (Proeminence-Shimadzu, Tóquio, Japão), segundo o método anteriormente validado por Pavei et al., 2010. Foi utilizada uma coluna Gemini RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) (Phenomenex, EUA), protegida por uma precoluna RP-18. A fase móvel consistiu em 0,1% v/v de ácido trifluoroacético (A) e metanol: TFA (99,9:0,1, v/v) (B) em um programa de gradiente linear, detecção efetuada a 325 nm; utilizaram o ácido clorogénico (Fluka, lote 455159/1, Suíça), ácido caféico (Extrasynthèse, lote 0381024, França) e rutina (Sigma, lote 128K1177, EUA) como padrões externos.

Avaliação do crescimento

No início e ao final de cada período experimental foram realizadas as pesagens dos peixes, foram calculados os seguintes parâmetros:

- Ganho de peso dos peixes (GP):

$GP (g) = \text{Peso médio final} - \text{Peso médio inicial}$

- Ganho de peso diário dos peixes (GDP):

$GPD (g) = GP / \text{número de dias do experimento}$

- Conversão alimentar aparente (CA):

$CA = \text{Alimento consumido (g)} / \text{ganho de peso (g)}$

- Biomassa final (BF):

$BF (g) = \text{Peso médio final (g)} \times \text{Número de peixes analisados}$

Indução da Aerocistite por *Streptococcus agalactiae* inativado

Após os períodos de suplementação, os animais foram anestesiados com benzocaína (1g/10L) para a aplicação do estímulo lesivo na bexiga natatória anterior. Os animais foram novamente agrupados em delineamento inteiramente casualizado, em dois grupos para a indução da inflamação, onde, um grupo recebeu 0,5 mL de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65% (grupo controle negativo) e os outros grupos receberam o mesmo volume dessa solução, contendo 3×10^8 UFC de *S. agalactiae*, inativada pelo calor (banho-maria a 40° C, por 30 minutos). Após a indução do processo inflamatório, os animais foram banhados em solução de cloreto de sódio.

Efeito da aerocistite

Após os períodos de suplementação os animais foram desafiados, conforme descrito acima, e nos tempos pré-determinados de 6; 12 e 24 horas pós-estímulo (HPE), os peixes foram mortos por aprofundamento do plano anestésico em solução de benzocaína (1:20 000) diluída em álcool 98° (0,1 g/mL) (Wedemeyer, 1970). A seguir foi coletado sangue por punção do vaso caudal de cada peixe, obtendo 0,5 mL de sangue com EDTA 10% para realização da contagem de eritrócitos e leucócitos e determinação do hematócrito (Goldenfarb et al., 1971). A partir das amostras sanguíneas, as extensões foram confeccionadas segundo Tavares-Dias e Moraes, 2006.

Para a contagem total e diferencial das células (CC) acumuladas no foco inflamatório, a bexiga natatória foi lavada com 0,5 ml de PBS, com EDTA a 0,09%

e o exsudato recolhido, e utilizando-se os procedimentos descritos por Martins et al. (2009) e colorações segundo Tavares-Dias e Moraes, 2007.

Análise histomorfométrica das vilosidades intestinais

Após de processar o material para histopatologia segundo padronização do laboratório de Ictiopatologia da UNESP/FCAV. Foram tomados 5 vilos por lâmina em diferentes campos (5 lâminas por grupo) total medidas 25 em 400 vezes para as medições das vilosidades intestinais. O comprimento começando da muscular da mucosa e terminando no epitélio de revestimento no ápice do vilos, a medida do largo foi realizada na metade do vilos de epitélio de revestimento até o outro epitélio de revestimento.

Análise imuno-histoquímica

A tecnica foi padronizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP.

Cortes de 5 µm de espessura de baço incluídos em parafina foram confeccionados em lâminas silanizadas seguido da desparafinização em estufa a 60 °C e hidratadas em soluções decrescentes de xilol três vezes, durante 10 minutos cada e bateria de alcoóis 100, 90, 80, e 70% e lavagem final com água destilada por 5 minutos. Em seguida, procedeu-se ao bloqueio da proteína endógena (“Protein block Dako”), lavou-se três vezes por 5 minutos cada com PBS (pH 7,4) e posteriormente acrescentou-se o anticorpo primário (IgM RP024 DBS) (1:250) permanecendo na câmara úmida durante 2 horas a temperatura

ambiente (23°C). Em seguida, lavou-se três vezes com PBS (pH 7,4) durante 5 minutos e colocou-se o anticorpo secundário (“Envision+Dual link System-HRP Dako”) para incubação na câmara úmida, durante 60 minutos, em temperatura ambiente (23°C).

Para a revelação utilizou-se o cromógeno diaminobenzidina (1:200) (DAB, Dako). O tempo de revelação foi de 2 minutos. Para parar a reação deixou-se as lâminas em água destilada. Como controle positivo utilizou-se tecido de tonsila humana. Para o controle negativo optou-se por excluir o anticorpo primário da reação conservando os outros passos.

A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 15 segundos, com posterior lavagem em água corrente, seguida de desidratação em soluções crescentes de alcoóis e xilol, montados com DePex (Gurr® cód. 361254D). As lâminas foram analisadas com microscópio de luz Olympus BX51 nos aumentos de 40, 100, 200, 400 e 1000 vezes. A contagem das células imunomarcadas foi realizada a partir da captura de cinco campos em 40 vezes com câmera Olympus DP12 (software cellSens Standard 1.5 Olympus Corporation®) acoplada em microscópio de luz Olympus BX51 e contadas com o software Image-Pro Plus versão 6,3.

Análises estatísticas

A determinação quantitativa das áreas dos picos nos cromatogramas foi realizada utilizando as equações de regressão do ácido clorogénico (CLA), ácido cafeínico (CFA), e as curvas de calibração de rotina (RUT) (Pavei et al., 2012).

Os cálculos dos níveis de alcaloides oxindólicos (AO), derivados do ácido quinóvico (DAQ) e polifenóis de baixo peso molecular (PBM) foram realizados utilizando a equação: $A = \frac{1}{2} h \cdot W_b$, para calcular a área de um pico (Pavei et al, 2010). O delineamento experimental foi realizado em DIC.

Os demais resultados foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ao nível de significância de 5% (Snedecor & Cochran, 1974).

RESULTADOS

A análise de HPLC-PDA do extrato aquoso de casca de *U. tomentosa* revelou três compostos característicos desta planta, confirmando assim, a identidade da amostra. Observou-se que os alcalóides oxindólicos (AO) foram os mais concentrados ($19.66 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$), seguido pelos polifenóis de baixo peso molecular (PMB) ($13.25 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$) e em menor concentração os derivados de ácido quinóvico (DAQ) com média total de $7.46 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ (Figura 1).

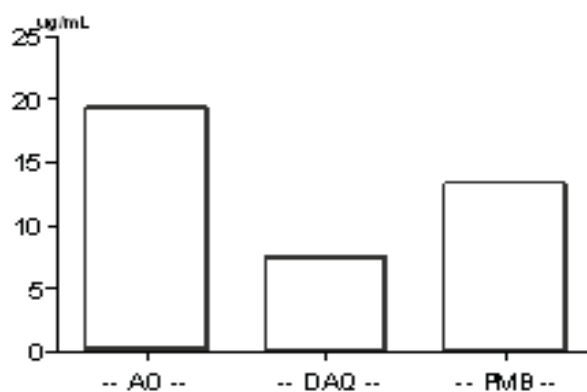


Figura 1. Concentrações de derivados de alcaloides oxindólicos (AO), derivados do ácido quinóvico (DAQ) e polifenóis de baixo peso molecular (PMB) presentes no extrato aquoso de *U. tomentosa*. Os resultados estão expressos com a média \pm desvio-padrão.

Efeito da unha-de-gato sobre o desempenho zootécnico

Observou-se que o efeito da adição do extrato alcoólico de unha de gato nas rações nos níveis 150; 300; 450 mg/Kg incrementou todos os parâmetros do desempenho zootécnico, após três semanas de fornecimento comparado com os grupos controles ($P < 0,05$) (Figura 2 e Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios (respectivos erros-padrão) do peso final (Pf) em gramas, peso inicial (Pi) em gramas, ganho de peso (GP) em gramas, ganho em peso médio diário (GPD), biomassa final (Bf) em porcentagem, conversão alimentar aparente (CAA) e sobrevivência (S) de tilápias suplementadas com unha de gato durante três semanas

	Controle -	Controle +	Tto 75	Tto 150	Tto 300	Tto 450
Pf	113,40 ± 3,37 b	112,52 ± 3,90 b	122,30 ± 5,73 ab	132,37 ± 5,65 a	132,97 ± 4,09 a	131,85 ± 3,70 A
Bf	8505,00	8439,00	9172,50	9927,75	9972,75	9888,75
S	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Pi	79,91 ± 2,84 a	80,02 ± 3,17 a	80,80 ± 4,30 a	83,15 ± 4,01 a	82,51 ± 3,03 a	81,58 ± 4,70 A
GP	33,49 ± 0,53 b	32,50 ± 0,73 b	41,50 ± 1,43 ab	49,22 ± 1,64 a	50,46 ± 1,06 a	50,27 ± 1,00 A
GPD	1,59 ± 0,03 b	1,55 ± 0,03 b	1,98 ± 0,07 ab	2,34 ± 0,08 a	2,40 ± 0,05 a	2,39 ± 0,01 A
CAA	2,12 a	2,18 a	1,71 ab	1,44 b	1,41 b	1,41 B

¹ Médias (n=25) na mesma linha, seguidas por letras diferentes diferem entre si ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

² As letras comparam na linha os diferentes tratamentos.

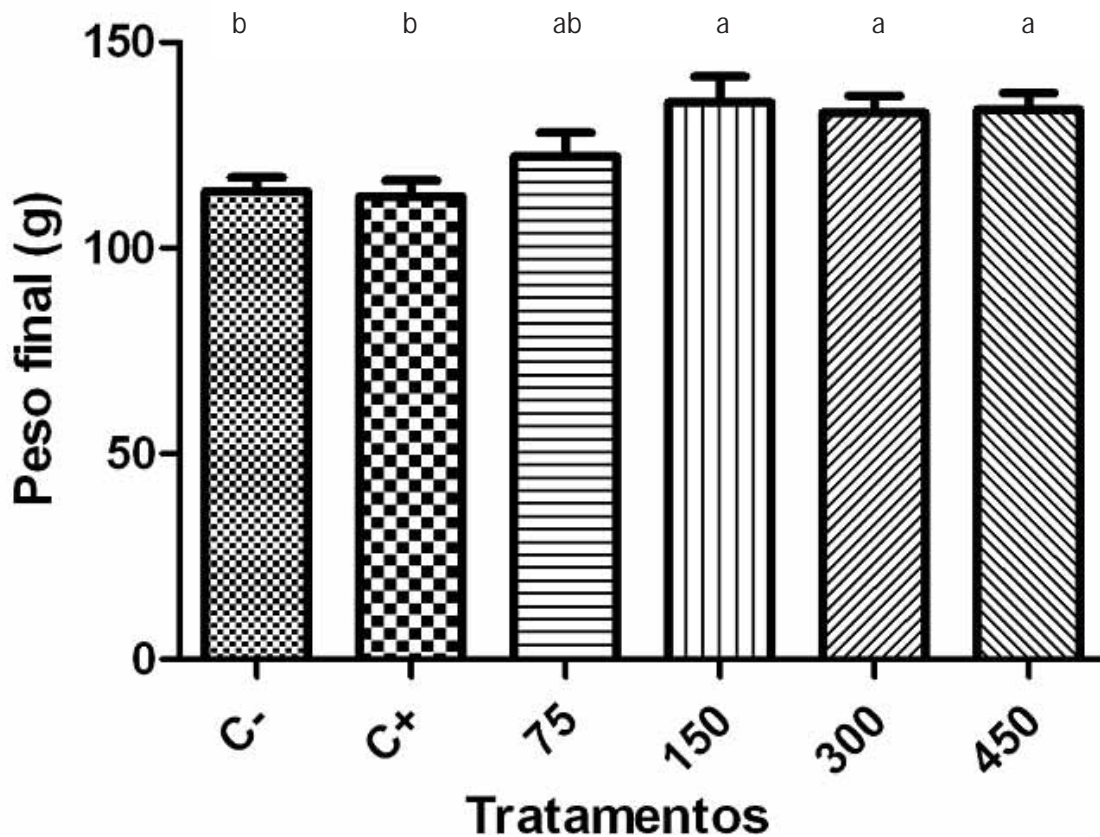


Figura 2. Efeito do extrato alcoólico de unha de gato na ração sobre o peso final dos animais (3 semanas). Os resultados estão expressos com a média \pm erro-padrão (N=25). Letras diferentes significam diferenças significativas nos tratamentos.

Efeito da unha de gato sobre a atividade imunológica

Contagem de células sanguíneas

A contagem de células sanguíneas (hemácias e leucócitos) ao final do período experimental de três semanas está expressa nas Tabelas 4 e 5 respectivamente. Estes resultados revelaram que não houve diferença na quantidade de hemácias nos três tempos avaliados.

Tabela 4- Valores médios (respectivos erros-padrão) do número de eritrócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)

	6h			24h			48h		
Controle -	433,33	± 51,37	Aa	99,14	± 55,87	Ab	350	± 42,67	Aa
Controle +	267,14	± 126,28	Ba	165,29	± 21,16	Aa	214,71	± 93,84	Aa
Tto 75 mg/Kg	235,14	± 105,81	Ba	191	± 26,51	Aa	328,28	± 63,1	Aa
Tto 150 mg/Kg	459,43	± 88,37	Aa	147,17	± 33,83	Ab	217	± 125,53	Ab
Tto 300 mg/Kg	422,33	± 45,09	Aa	199,29	± 41,5	Ab	337,71	± 337,71	Aab
Tto 450 mg/Kg	373,43	± 83,61	Aba	186,17	± 60,17	Ab	252,86	± 252,86	Aab

¹ Médias (n=7) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05).

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada período, enquanto as letras minúsculas comparam na linha o número de eritrócitos em sangue periférico.

Diferentemente do que aconteceu com o número de hemácias, os tratamentos afetaram o número de leucócitos. Às 6 horas após inoculação observou-se que os tratamentos 300 e 450 mg/Kg promoveram aumento em relação aos grupos controles. Já às 24 horas observou-se uma diminuição nos grupos suplementados com as maiores quantidades de unha de gato (150; 300 e 450 mg/Kg) em relação ao grupo controle positivo e 75 mg/Kg. Às 48 horas após estímulo inflamatório observou-se estabilização entre os tratamentos, sendo o grupo controle negativo menor que todos os demais tratamentos (Figura 3 e tabela 5) (P<0,05).

Tabela 5- Valores médios (respectivos erros-padrão) do número de leucócitos em sangue ($\times 10^3/\mu\text{L}$)

	6h			24h			48h		
Controle -	200,84	± 22,13	Ca	139,43	± 13,47	Ba	119,1	± 8,64	Ba
Controle +	239,29	± 12,83	BCa	302,57	± 6,56	Aa	248,37	± 26,16	Aa
Tto 75 mg/Kg	271,4	± 21,31	ABCa	230,14	± 12,15	Aa	265,6	± 7,68	Aa
Tto 150 mg/Kg	293	± 18,6	ABa	79,5	± 15,92	Bb	258,81	± 9,04	Aa
Tto 300 mg/Kg	331,5	± 25,89	Aa	94,29	± 19,21	Bb	254,33	± 20,92	Aa
Tto 450 mg/Kg	342,67	± 21,28	Aa	111,71	± 20,9	Bb	277,33	± 30,6	Aa

¹ Médias (n=7) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05).

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada período, enquanto as letras minúsculas comparam na linha o número de leucócitos em sangue periférica.

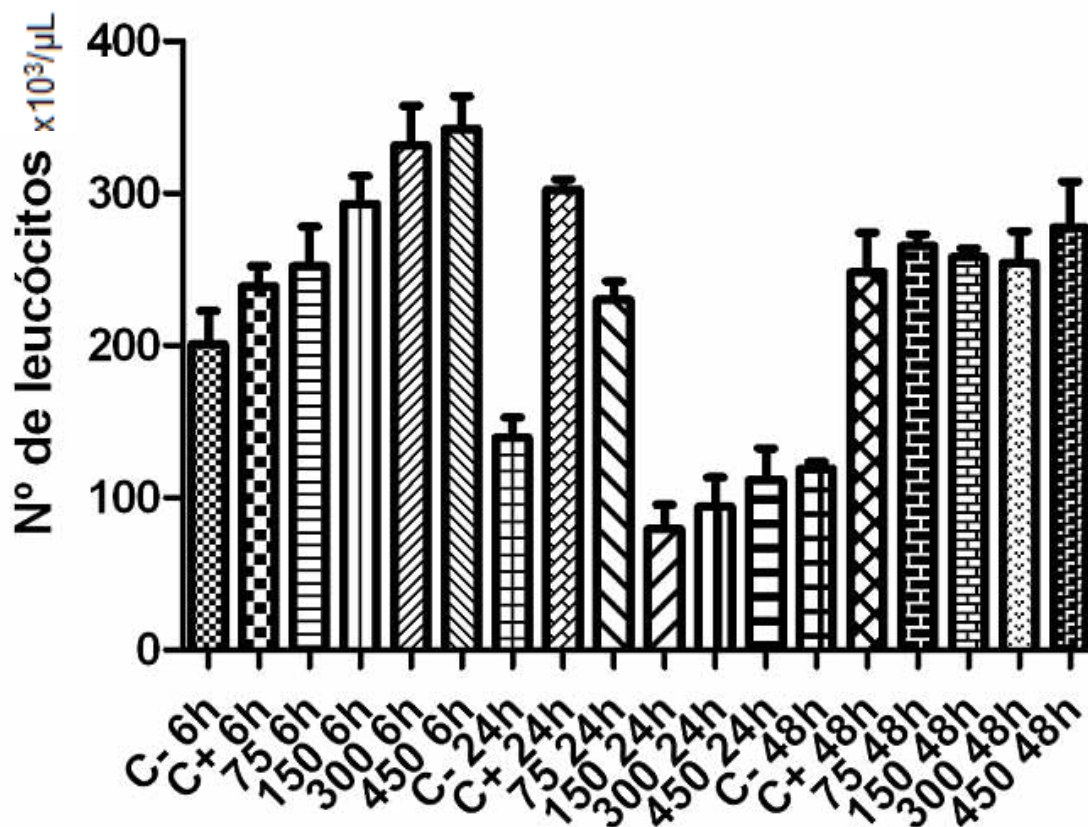


Figura 3: Efeito do extrato alcoólico de unha de gato na ração sobre o número de leucócitos (3 semanas). Os resultados estão expressos com a média \pm erro-padrão (N=7).

Os resultados do hematócrito também não apresentaram diferenças entre os tratamentos em nenhum dos tempos avaliados (Tabela 6).

Tabela 6- Valores médios (respectivos erros-padrão) e análise de variância estatística Hematocrito

	6h		24h		48h	
Controle -	31,17	\pm 1,7	35,71	\pm 1,76	34,71	\pm 1,13
Controle +	31,14	\pm 1,99	35	\pm 2,32	37,29	\pm 3,27
Tto 75 mg/Kg	30,29	\pm 2,74	34,71	\pm 1,02	33,14	\pm 1,34
Tto 150 mg/Kg	33,71	\pm 2,73	31,14	\pm 1,52	35,43	\pm 1,77
Tto 300 mg/Kg	34,83	\pm 1,4	35,86	\pm 0,83	37,57	\pm 0,43
Tto 450 mg/Kg	31,28	\pm 2,2	33,86	\pm 1,89	34,14	\pm 1,1

¹ Não houve diferença estatística (P>0,05) entre os tratamentos.

Contagem de células totais no exsudato inflamatório na bexiga natatória

A contagem de células totais no exsudato inflamatório das tilápias desafiadas mostrou que às 6 horas depois de inoculadas não houve diferença significativa entre os tratamentos. 24 horas pós-inoculação observou-se que a contagem nos tratamentos 150; 300 e 450 mg/Kg apresentaram maior número de leucócitos que os controles positivo e negativo. No último tempo avaliado após desafio, observou-se que os tratamentos 150 e 300 mg/Kg foram significativamente maiores ($P < 0,05$) que os grupos controles (Tabela 7 e Figura 4). Comparando os diferentes tempos avaliados após o desafio, observou-se que o maior número de leucócitos no exsudato apresentou-se 24 e 48 horas após inoculação de *Streptococcus agalactiae*.

Tabela 7- Valores médios e respectivos erros-padrão do número de leucócitos no exsudato

	6h			24h			48h		
Controle -	187,17	± 54,39	Aa	222,43	± 56,67	Da	281	± 105,29	Ba
Controle +	230,8	± 80,93	Aa	760,83	± 304,65	CDa	386,1	± 61,02	Ba
Tto 75 mg/Kg	211,6	± 49,42	Ab	1223	± 259,79	BCa	802	± 162,51	ABab
Tto 150 mg/Kg	208,8	± 45,44	Ab	1856,4	± 406,45	ABa	1376,67	± 112,05	Aa
Tto 300 mg/Kg	313,8	± 21,65	Ab	2489,67	± 336,37	Aa	1599,5	± 182,82	Aa
Tto 450 mg/Kg	304,47	± 53,57	Ab	1748,83	± 197,65	ABa	872,8	± 134,49	ABab

¹ Médias (n=7) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada período, enquanto as letras minúsculas comparam na linha o número de leucócitos no exsudato.

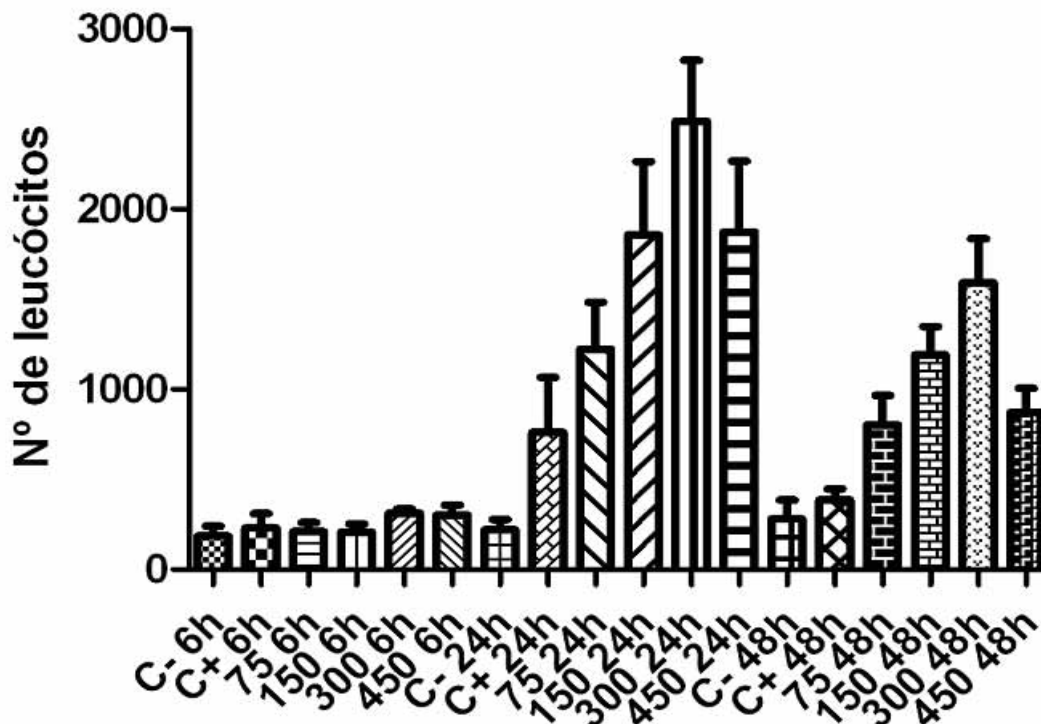


Figura 4. Efeito do extrato alcoólico de unha de gato na ração sobre o número de leucócitos no exsudato da bexiga natatória dos animais (3 semanas). Os resultados estão expressos com a média \pm erro-padrão (N=7).

Análise histopatológica

Os resultados da análise histopatológica revelaram que os tratamentos não influenciaram as brânquias, apresentando em todos os casos ligeira hiperplasia e congestão. No caso do fígado, observou-se que alguns peixes apresentaram ligeira esteatose, observada em todos os tratamentos e tempos de avaliação (Figura 5).

Diferente do fígado onde não foi encontrado necrose em nenhum dos casos, no rim, nos tratamentos 300 e 450 mg/Kg foram encontrados focos isolados de necrose, assim como degeneração dos túbulos renais e perda do espaço de Bowman (Figura 6).

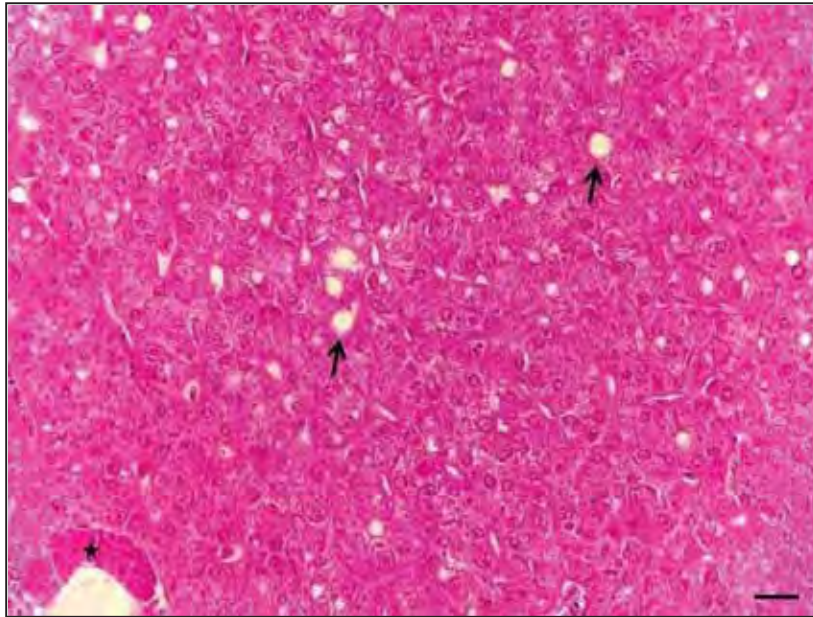


Figura 5: Fotomicrografia de hepatopâncreas de *Oreochromis niloticus*. Controle negativo, não foram observadas alterações significativas no tecido além de leve esteatose em todos os tratamentos . Estrela marca tecido pancreático. HE. Barra 100 μ m.

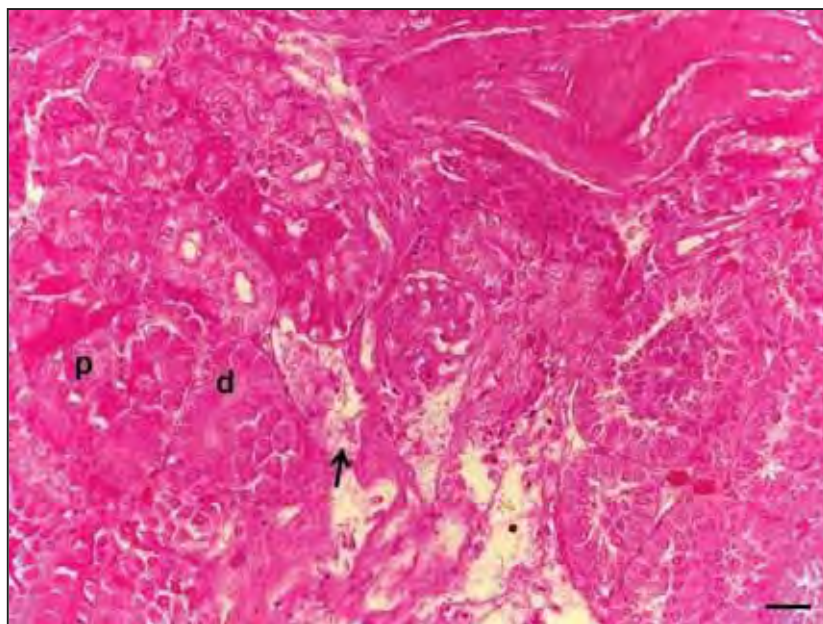


Figura 6: Fotomicrografia de rim cefálico de *Oreochromis niloticus*. Tratamento 5 (300 mg/Kg de extrato de unha de gato na ração), 6 horas após inoculação de *Streptococcus agalactiae*. Observa-se necrose (seta), degeneração dos túbulos renais (d), aumento do tufo glomerular com perda do espaço de Bowman (p). HE. Barra 100 μ m.

No caso do intestino, observou-se aumento no comprimento das vilosidades e aumento no número de células de Goblet nos tratamentos 75 e 300 mg/Kg em relação ao grupo controle positivo (Figura 7 e Tabela 8).

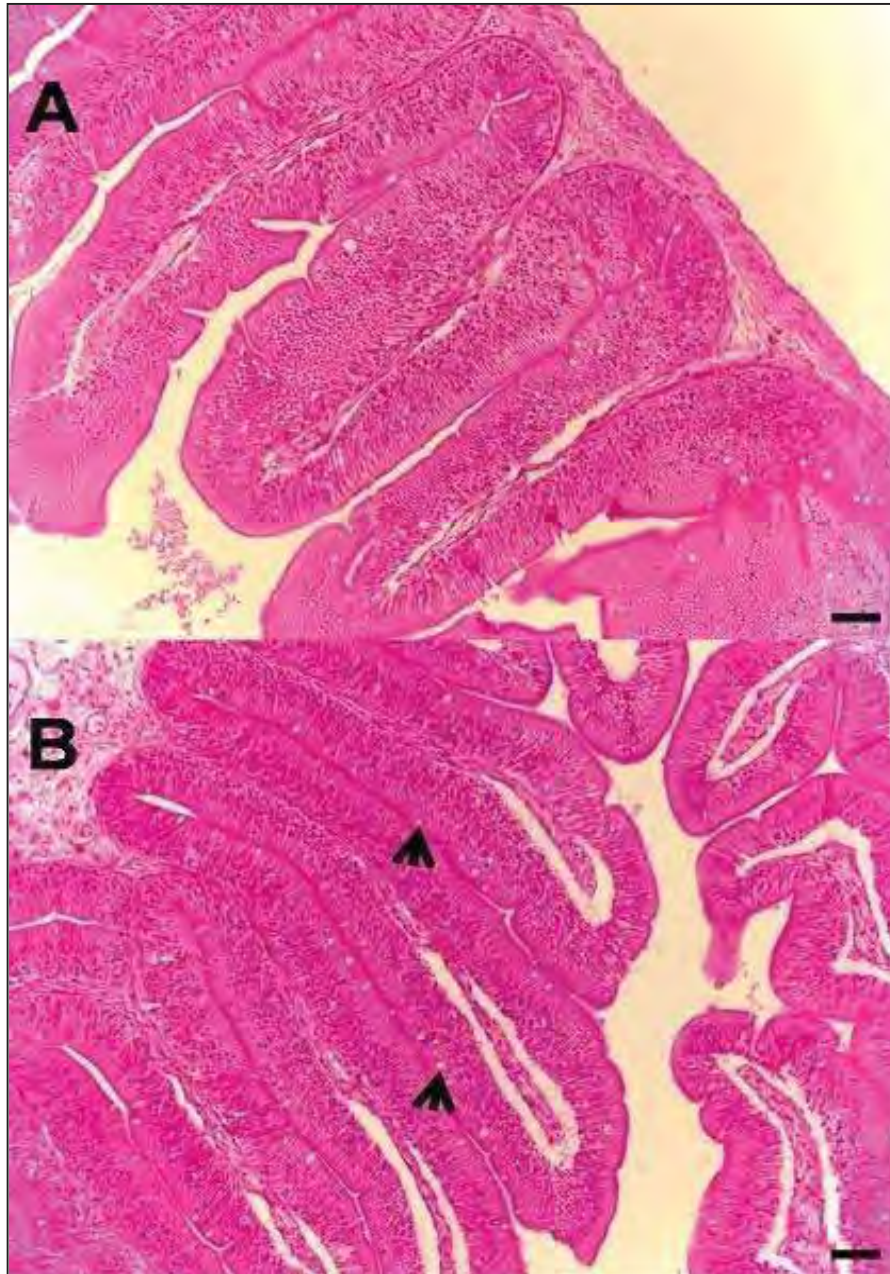


Figura 7: Fotomicrografia de intestino de *Oreochromis niloticus*. A: Controle negativo, não foram observadas alterações significativas no tecido. B: Tratamento 5 (300 mg/Kg de extrato na ração), 6 horas após inoculação da bactéria. Observa-se aumento do tamanho dos vilos intestinais, assim como, aumento no número de células de Globet (seta). HE. Barra 100 μ m.

Tabela 8- Valores médios (respectivos erros-padrão) do tamanho das vilosidades intestinais (um)

	Comprimento			Largura				
Controle -	437,94	±	9,05	ab	124,72	±	6,15	a
Controle +	374,44	±	39,68	b	115,68	±	6,12	a
Tto 75 mg/Kg	457,84	±	20,76	a	123,63	±	7,28	a
Tto 150 mg/Kg	450,34	±	15,82	ab	102,53	±	4,98	A
Tto 300 mg/Kg	471,16	±	5,61	a	107,28	±	3,56	a
Tto 450 mg/Kg	401,12	±	3,91	ab	109,2	±	3,02	a

¹ Médias (n=7) na mesma linha, seguidas por letras diferentes diferem entre si (P>0,05) pelo teste de Tukey..

² As letras comparam na coluna os diferentes tratamentos.

No caso do baço, observou-se nos tratamentos 150; 300 e 450 mg/Kg hemorragia intensa, substituição dos folículos linfoides, assim como aumento da capsula esplênica (Figura 8). Além disso, às 6 horas após inoculação, foi observado aumento na quantidade e tamanho dos centros melanomacrófagos do tratamento 300 mg/Kg em relação ao grupo controle positivo. Transcorrido 24 horas após desafio os tratamentos 150; 300 e 450 foram significativamente maiores que os grupos controle positivo e negativo. Já às 48 horas após o estímulo inflamatório observou-se que o tratamento 75 mg/Kg foi significativamente maior que os demais grupos (Tabela 9 e Figura 9).

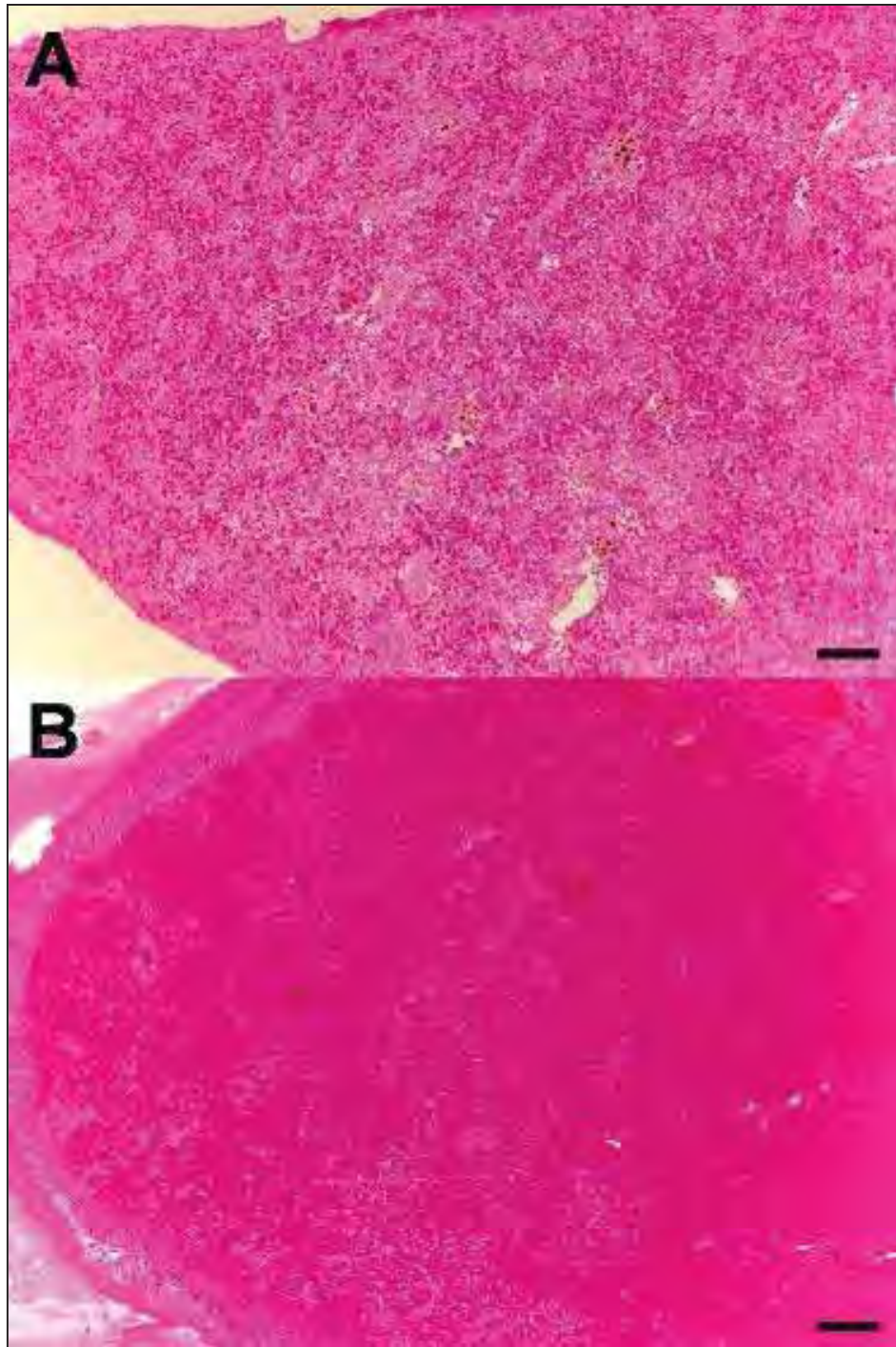


Figura 8: Fotomicrografia de baço de *Oreochromis niloticus*, A: Controle negativo, não foram observadas alterações significativas no tecido. ObservaM-se centros de melanomacrófagos. B: Tratamento 5 (300 mg/Kg de extrato na ração), 6 horas após inoculação da bactéria. Observa-se hemorragia intensa, substituição dos folículos linfóides e aumento da capsula esplênica. HE. Barra 400 µm.

Tabela 9- Valores médios (respectivos erros-padrão) e análise de variância estatística da área dos centros melanomacrófagos(um)

	6h	24h	48h
Controle -	1556,06 ± 281,60 ab	1146,89 ± 130,32 c	1295,19 ± 101,38 b
Controle +	1303,77 ± 123,64 b	1237,05 ± 370,49 c	1101,88 ± 193,86 b
Tto 75 mg/Kg	4138,34 ± 1139,50 ab	1971,21 ± 148,76 bc	6424,97 ± 1392,20 a
Tto 150 mg/Kg	4957,59 ± 966,64 ab	4297,05 ± 508,50 a	2696,32 ± 197,04 b
Tto 300 mg/Kg	5139,54 ± 640,93 a	2668,67 ± 274,87 b	2683,76 ± 225,26 b
Tto 450 mg/Kg	4325,10 ± 445,77 ab	3407,51 ± 276,61 ab	3830,09 ± 638,31 ab

¹ Médias (n=7) na mesma linha, seguidas por letras diferentes diferem entre si (P>0,05) pelo teste de Tukey.

² As letras comparam na coluna os diferentes tratamentos.

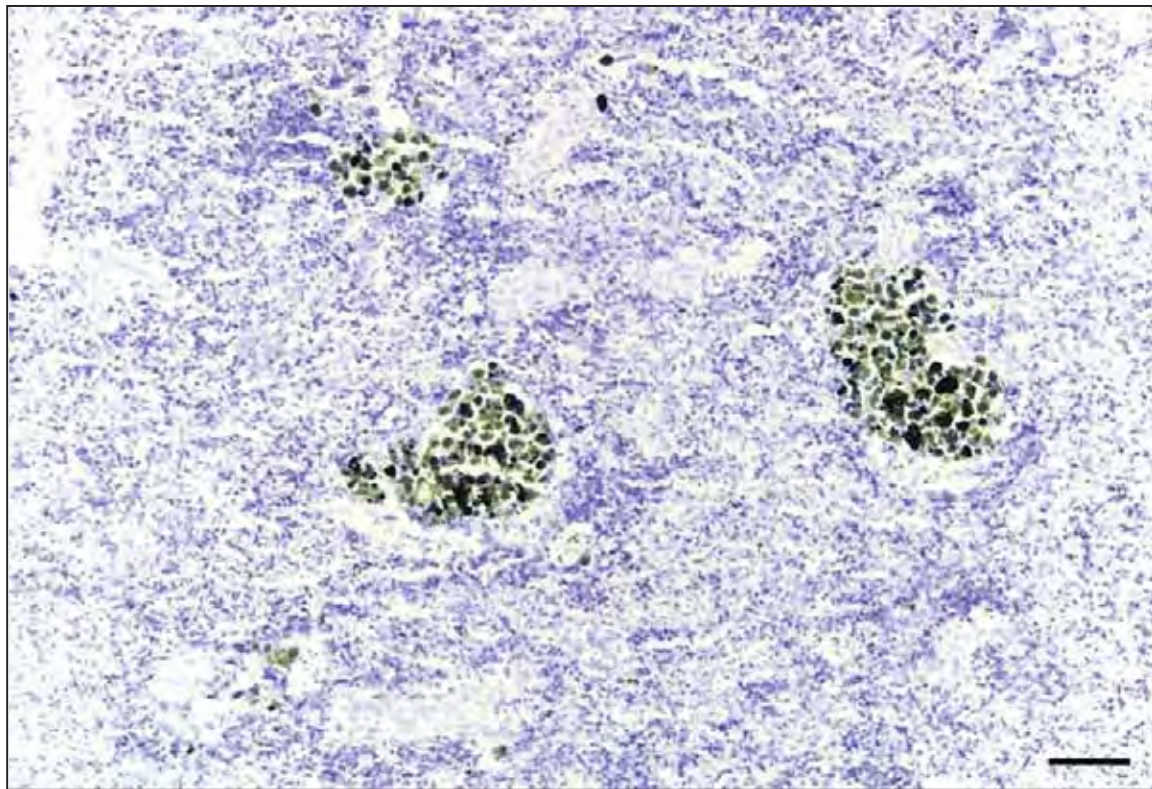


Figura 9: Fotomicrografia de baço de *Oreochromis niloticus*, A: Tratamento 300 mg/Kg, 24 horas, observam-se centros de melanomacrófagos. B: DAB. Barra 100 µm.

Análise imunohistoquímica:

Para o anticorpo anti-IgM, observou-se que às 6 horas após inoculação da bactéria não houve diferença significativa entre os tratamentos, diferente do observado às 24 horas, onde o tratamento 450 mg/Kg foi o maior, seguido por os tratamentos 75 e 300 mg/Kg, sendo estes maiores que os grupos controles positivo e negativo. Às 48 horas após desafio não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 10 e Figura 13).

Tabela 10- Valores médios (respectivos erros-padrão) de imunomarcação positiva de IgM em baço

	6h			24h			48h		
Controle -	5	± 0,84	Aa	7	± 1,38	Ca	6,4	± 0,87	Aa
Controle +	4,4	± 0,75	Aa	6,6	± 1,83	Ca	12,4	± 2,23	Aa
Tto 75 mg/Kg	13,4	± 4,62	Aa	19	± 2,5	Ba	8,2	± 1,5	Aa
Tto 150 mg/Kg	1,6	± 0,4	Aa	11,6	± 3,31	BCa	4	± 0,95	Aa
Tto 300 mg/Kg	3,6	± 0,68	Ab	20,6	± 4,12	Ba	3,2	± 0,58	Ab
Tto 450 mg/Kg	5,4	± 1,44	Ab	34	± 1,36	Aa	14,8	± 4,6	Ab

¹ Médias (n=7) na mesma linha, seguidas por letras diferentes diferem entre si (P>0,05) pelo teste de Tukey.

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada período, enquanto as letras minúsculas comparam na linha a imunomarcação positiva de IgM nos diferentes tempos.

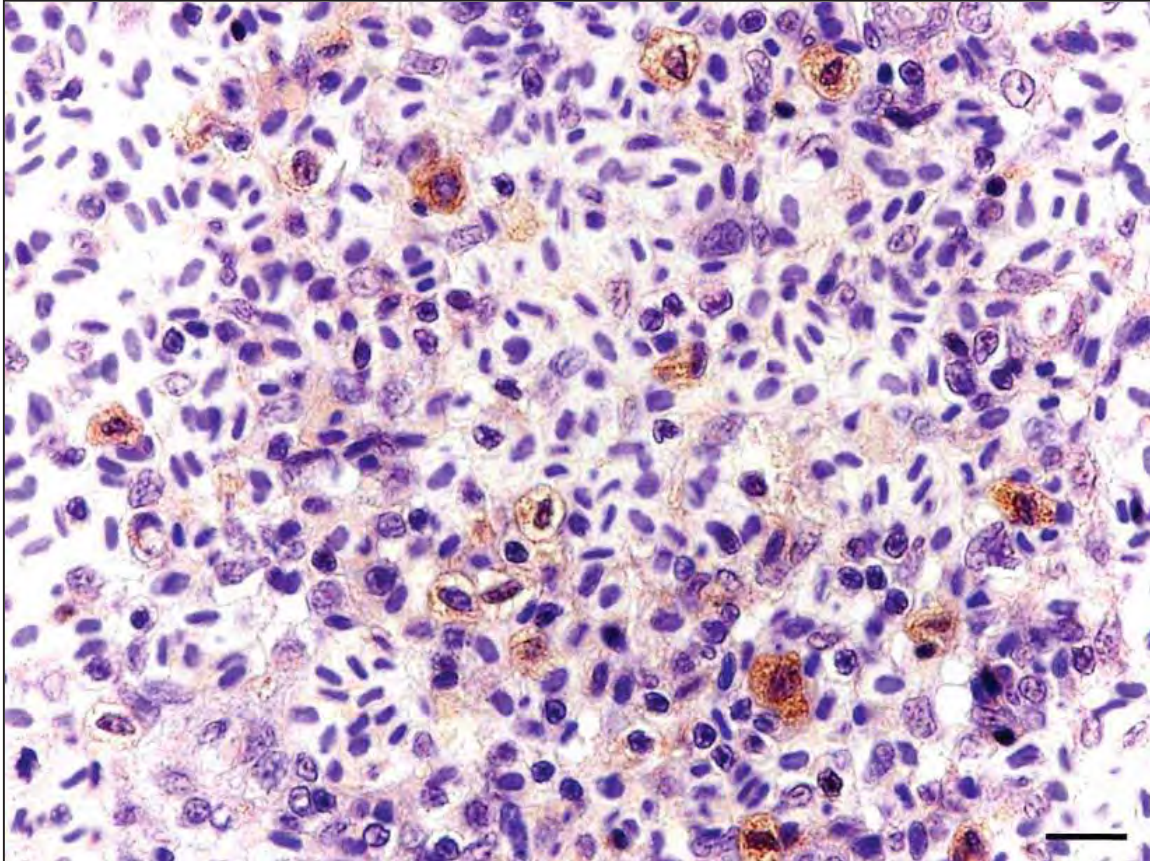


Figura 10: Fotomicrografia de baço de *Oreochromis niloticus*, imunomarcção positiva de anti-IgM após 24 horas após desafio com *Streptococcus agalactiae* (macrófagos). Tratamento 6 (450 mg/Kg de extrato na ração). DAB. Barra=10µm.

DISCUSSÃO:

A planta *U. tomentosa* tem gerado a atenção nos cientistas de diversas áreas, devido a sua potente ação imunoestimulante. Na aquicultura, o uso de plantas medicinais também está sendo explorado com considerável interesse devido à vantagens que apresenta frente ao uso de produtos químicos. Neste trabalho, se descreve por primeira vez o uso do extrato desta planta em peixes, sendo realizados diferentes ensaios com o objetivo de avaliar seu efeito sobre o desempenho zootécnico e atividade imune.

Após suplementação dietética com o extrato etílico de *U. tomentosa*, os princípios ativos encontrados corroboram os achados na literatura para a planta, Hemingway e Phillipson, (1974) e Keplinger et al., (1999) (alcalóides oxindólicos), Aquino et al. (1989) (derivados do ácido quinóico) e Bors et al., (2012) (polifenóis de baixo peso molecular), os quais concordam com os achados neste trabalho, confirmando a autenticidade e qualidade do extrato utilizado, o qual é importante pelo grande variação na quantidade dos compostos ativos em derivados de plantas.

Neste estudo, foi observado um incremento de diferentes parâmetros do desempenho zootécnico nos animais suplementados, atribuindo em parte, tal fato ao maior comprimento das vilosidades intestinais nos tratamentos, com o qual aumentaria a superfície de absorção e melhor aproveitamento dos nutrientes.

É a primeira vez que se reporta aumento nos parâmetros de crescimento em peixes com o uso de unha de gato, uma vez que este produto tem sido testado *in vivo* somente em humanos (Kepingler et al., 1999), bovinos (Bednarek et al. 2002) e roedores (Cisneros et al.; 2005; Eberlin et al., 2005; Nogueira et al., 2010), sendo que o crescimento não foi considerado ou o tempo de fornecimento foi muito curto para observar a influência da planta sobre esta característica nestes seres.

O incremento do desempenho zootécnico em peixes suplementados com extrato de outras plantas como extrato de poli-ervas “ImmunoPlus” em *Labeo rohita* suplementados durante 10; 30 e 45 dias, sendo que apresentou incremento no peso final em todos os tempos avaliados (Kumari et al., 2007).

Os resultados do número de hemácias e do hematócrito mostraram que não houve influência dos tratamentos, o qual foi anteriormente relatado por Pilarski et al. (2010) em sangue de camundongos após suplementação durante 21 dias. Bednarek et al. (2004) também observaram que os tratamentos não influenciaram o número de eritrócitos em bezerros suplementados durante 8 dias.

Sheng et al. (2009) e Akesson et al. (2003) observaram o aumento de leucócitos em sangue periférico de camundongos suplementados com unha de gato, resultados que concordam com os achados deste trabalho às 6 HPD, onde foi observado um incremento com efeito dose dependente sobre o número de leucócitos sanguíneos.

Diferente do que aconteceu, no exsudato da bexiga natatória onde não houve influência dos tratamentos às 6 HPD, o qual concorda com os achados de Eberlin et al. (2005), devido provavelmente ao curto tempo entre a estimulação e a toma da amostra, não sendo o suficiente para observar a resposta inflamatória.

No entanto, 24 HPD, observou-se aumento no número de leucócitos no foco inflamatório, inversamente proporcional ao que aconteceu em sangue, onde nas concentrações mais baixas do extrato havia grande quantidade de leucócitos e nas mais altas o número foi menor, apresentando um efeito dose dependente sobre os componentes celulares do exsudato. Devido provavelmente ao processo de diapedese dos leucócitos para o foco inflamatório (Tizard, 2002; Pilarski et al., 2010), o qual concorda com os resultados do exsudato inflamatório, onde houve incremento do número de leucócitos.

Às 48 HPD, o aumento de leucócitos no sangue em todos os tratamentos inoculados com a bactéria, explica-se pelo retorno das células do exsudato, uma

vez que, coincidiu com diminuição do número de leucócitos do exsudato no mesmo tempo e/ou a mobilização dos compartimentos de reserva dos leucócitos, o que não pode ser confirmado pela ausência de análise da morfologia dos leucócitos (dados ainda não analisados). Estes resultados evidenciam o efeito da unha de gato sobre a quantidade de leucócitos no sangue e no exsudato, já que em todos os grupos suplementados, verificou-se um efeito dose dependente e superiores aos grupos controles.

Os mecanismos fisiológicos da imunomodulação não são totalmente elucidados. Atribui-se a melhora na resposta inflamatória e imune à capacidade antioxidante da planta, com melhora na homeostase dos animais e conseqüente melhora na resposta dos hospedeiros corroborando com outros trabalhos encontrados (Sandoval et al. 2002 e Sandoval-Chacon et al. 1998). Por outro lado, Sheng et al., (2000b), atribuíram o efeito mieloestimulante à indução da produção de citocinas endôgenas, sendo demonstrado por Lemaire et al. (1999), que reportaram a estimulação de IL-1 e IL-6 em macrófagos de ratos.

Estes mecanismos são importantes na resistência dos peixes aos agentes infecciosos devido a que a IL-1 induz quimiocinas e ativa a adesão de moléculas promovendo o movimento e acumulação de neutrófilos no local da infecção (Liu et al., 1992; Rogers et al., 1994). Também a IL-1, em sinergia com a IL-2, ativa macrófagos via IFN-gama, o qual é essencial na resposta imune do peixe frente a bactérias (Uthaisangsook et al., 2002).

Os centros melanomacrófaos são agrupamentos de macrófagos pigmentados, presentes nos órgãos hematopoiéticos, principalmente no baço de teleosteos superiores como a tilápia (El-Saydah et al. 2010). Na literatura pode-se

observar que o aumento na área dos melanomacrófagos esta relacionado com o aumento da resposta imune devido a que entre suas funções estão a destruição do material exógeno e participação do processamento do antígeno (Agius e Roberts, 2003).

Neste estudo, verificou-se que 6 HPD, a área dos melanomacrófagos foi significativamente maior nos grupos tratados, em comparação com o grupo controle positivo e após 24 horas, os peixes suplementados com 150; 300 e 450 mg/Kg na ração também foram maiores que o grupo controle positivo. Estes resultados concordam com os achados por De Vico et al., (2008) em dourada, na qual o tamanho dos centros melanomacrófagos era proporcional ao grau de infestação.

A diferença do dano a nível histológico causado pelos compostos tóxicos de algumas plantas como a *Jatropha gossypifolia* foi testada em ratos (Mariz et al. 2006). Neste ensaio não houve influência dos tratamentos na análise histopatológica nas brânquias e no fígado, devido provavelmente às baixas concentrações usadas, ao fato de estar incluída na ração e à ampla margem de segurança deste produto.

O uso da unha de gato na ração não só influenciou a resposta imune inata, também influenciou a resposta adaptativa positivamente, o qual foi confirmado pelo aumento da imunomarcção positiva de anti-IgM observada 24 HPD. Trabalhos anteriores têm reportado o aumento desta imunoglobulina em peixes como um indicador de uma melhor resposta imune (Hedfords et al., 2012), devido a que a IgM é particularmente eficaz na ativação do complemento, contribuindo com a opsonização por ativação do complemento C3b e finalmente a união ao antígeno (Welleck et al., 1976).

Concluí-se que o uso de *Uncaria tomentosa* na ração, principalmente 300mg/Kg, durante 21 dias, incrementa o desempenho zootécnico e a atividade imune da tilapia nilótica. Adicionalmente, foi constatado que o uso desta planta via oral é viável em peixes, sem constatação de mortalidade e achados histopatológicos ou sinais clínicos de intoxicação. Este estudo fornece dados suficientes para afirmar que o extrato desta planta funciona como um eficiente imunoestimulante e promotor do crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS C.; ROBERTS R. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **J Fish Dis.** V.9, p.499-509. 2003.

AKESSON C.; LINDGREN H.; PERO R.; LEANDERSON T.; IVARS F. Quinic acid is a biologically active component of *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100R. **IntImmunopharmacol.** 5, p. 219-229, 2005.

AMARAL S.; MIRA L.; NOGUEIRA J.; SILVA A.; FLORÊNCIO M. Plant Extracts with Anti-inflammatory Properties – A New Approach for Characterization of their Bioactive Compounds and Establishment of Structure - Antioxidant Activity Relationships. **Bioorg. Medicinal Chem.** V. 17, p. 1876-1883. 2009.

ANDERSSON L.; PERSSON C. Circumscription of the tribe Cinchoneae (Rubiaceae) – A cladistic approach. **Pl. Syst. Evol.** 178, p. 65–94, 1991.

BELO M.; MORAES J.; SOARES V.; MARTINS M.; BRUM C.; MORAES F. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacu. **Pesqui Agropecu Bras.** V. 47, p. 1015-1021. 2012.

CLAUDIANO G.; DIAS NETO J.; SAKABE R. et al. Eficácia do extrato aquoso de "*Terminalia catappa*" em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. **Rev. Bras. Saúde Prod Anim.** V. 10, n. 3, p. 625-636, 2009.

DE VICO G.; CATALDI M.; CARELLA F.; MARINO F.; PASSANTINO A. Histological, Histochemical and Morphometric Changes of Splenic Melanomacrophage Centers (Smmcs) in Sparicotyle-Infected Cultured Sea Breems (*Sparus aurata*). **Immunopharmacol Immunotoxicol.** V. 30, n.1, p. 27-35. 2008.

EBERLIN S.; DOS SANTOS L.; QUEIROZ M. *Uncaria tomentosa* extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Int Immunopharmacol.** V. 5, n 7-8, p.1235-1246. 2005.

EL-SAYDAH H.; SUZAN B.; TAMER E.; HUDA F. Haemopoiesis in the head kidney of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae): a morphological (optical and ultrastructural) study. **Fish Physiol Biochem.** V.36, n.3, p.323–336. 2010.

FURUYA W. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias.** 100p. 2010.

GOLDENFARB P.; BOWYER F.; HALL E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Am J Clin Pathol.** V.56, p. 35-39 1971.

HEDFORS I.; BAKKE H.; SKJØDT K.; GRIMHOLT U. Antibodies recognizing both IgM isotypes in Atlantic salmon. **Fish Shellfish Immunol.** V. 33, n. 5, p.1199–1206. 2012.

KAISER S.; VERZA S.; MORAES R.; DE RESENDE P.; BARRETO F.; PAVEI C.; ORTEGA G. Cat's claw oxindole alkaloid isomerization induced by common extraction methods. **Quimica Nova**. 2013, (artigo aceito).

KEPLINGER K.; LAUS G.; WURM M.; DIERICH M.; TEPPNER H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.—Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **J. ethnopharmacol.** V. 64, p. 23–34. 1999.

KLOUCEK P.; POLESNY Z.; SVOBODOVA B.; VLKOVA E.; KOKOSKA L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. **J. ethnopharmacol.** V. 3, n. 99(2), p. 309-12. 2005.

LEMAIRE I.; ASSINEWE V.; CANO P.; AWANG D.; ARNASON J. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Una de Gato). **J Ethnopharmacol.** V. 64, n.2, p.109–115. 1999.

LIU Z, SIMPSON RJ, CHEERS C. Recombinant interleukin-6 protects mice against experimental bacterial infection. **Infect Immun.** V.60, p.4402– 4406. 1992.

MARIZ S.R.; CERQUEIRA G.S.; ARAÚJO W.C.; DUARTE J.C.; MELO A.F.M.; SANTOS H.B.; OLIVEIRA K.; MELO DINIZ M.F.F.; MEDE I.A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Rev. bras. Farmacogn.** V. 16, n. 3, p. 372-8. 2006.

MORAES F.; MORAES J. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa. p. 625-723. 2009.

MUHAMMAD I.; DUNBAR D.; KHAN R.; GANZERA M.; KHAN I. Investigation of Uña de Gato 17-deoxyloganic acid and 15N NMR spectroscopic studies on

pentacyclindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Phytochem.** V. 57, p. 781-785. 2001.

OBREGON L. Cat's Claw, Genus *Uncaria*. Botanical, Chemical and Pharmacological studies of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (Rubiaceae) and *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. **Institute of American Phytotherapy**, Lima, Peru. 1995.

PAVEI C.; KAISER S.; BORRÉ G. L.; ORTEGA G. Validation of a LC method for polyphenols assay in cat's claw (*Uncaria tomentosa*). **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** V. 33, n. 17, p. 1551-1561. 2010.

PAVEI C.; KAISER S.; VERZA S.; BORRÉ G. L.; ORTEGA, G. HPLC-PDA method for quinovic acid glycosides assay in Cat's claw (*Uncaria tomentosa*) associated with UPLC/Q-TOF-MS analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.** V. 25, n. 62, p. 250-257. 2012.

REQUE, V.R.; MORAES, J.R.E., BELO, M.A.A., MORAES, F.R. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquacult.** V. 300, p. 37– 42. 2010.

ROGERS HW, TRIPP CS, SCHREIBER RD, UNANUE ER. Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. **J Immunol.** V. 153, p.2093–2101. 1994.

SALVADOR R.; MULLER E.; FREITAS J. et al. Isolation and characterization of *Streptococcus spp* group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Cienc. Rural.** V. 35, p. 1374-1378. 2005

SALVADOR R.; TOAZZA C.; MORAES J.; MORAES F. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Dis Aquat Org.** V. 98, n. 3, p 235-241. 2012.

SANDOVAL, M., OKUHAMA, N.N., ZHANG, X.J., CONDEZO, L.A., LAO, J., ANGELES, F.M., MUSAH, R.A., BOBROWSKI, P., MILLER, M.J., Antiinflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomed.** V.9, p.325–337. 2002.

SANDOVAL-CHACON, M., THOMPSON, J.H., ZHANG, X.J., LIU, X., MANNICK, E.E., SADOWSKA-KROWICKA, H., CHARBONNET, R.M., CLARK, D.A., MILLER, M.J., 1998. Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NFkappaB. **Aliment Pharmacol Ther.** V. 12, p.1279–1289.

SHENG Y.; BRYNGELSSON C.; PERO R. Enhance DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-Med-100k, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **J Ethnopharmacol.** V. 96, p. 577-584. 2000a.

SHENG Y.; PERO RW.; WAGNER H. Treatment of chemotherapy induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomed.** V. 7, n. 2, p. 137-143. 2000b.

TAVARES-DIAS M.; MORAES F. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes, Characidae) intensively bred. **Hidrobiol.** V.16, p. 271-274. 2006.

TAVARES-DIAS M.; MORAES F. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. **J Fish Biol.** V.71, p. 383-388. 2007.

TIZARD I.R. Citocinas e sistema imune. In: Tizard, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução.** 6ª ed. São Paulo: Roca, 12, 140-153. 2002.

UTHAISANGSOOK S, NOORBIBI KD, SAMI LB, GOOD RA, HARAGUCHI S. Innate immunity and its role against infections. **Ann Allergy, Asthma, &, Immun** V.88, n.253– 65. 2002.

VAINIKKA A.; JOKINEN E.; KORTET R.; PAUKKU S. PIRHONEN J.; RANTALA M.; TASKINEN J. Effects of testosterone and B-glucan on immune function in tench. **J. Fish Biol.** V. 66, p. 348–361. 2005.

WEDEMEYER G. Stress of anaesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout. **J Fish Res Board Can.** V.27, p. 909-914. 1970.

WELLEK B.; HAHN H.; OPFERKUCH W. Opsonizing activities of IgG, IgM antibodies and the C3b inactivator-cleaved third component of complement in macrophage phagocytosis. **Agents Actions.** V. 6, p. 260-272. 1976.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

AKESSON C.; LINDGREN H.; PERO R.; LEANDERSON T.; IVARS F. Quinic acid is a biologically active component of *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100R. **IntImmunopharmacol.** 5, p. 219-229, 2005.

AMAR E.; KIRON V.; SATOH S.; WATANABE T. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defense mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquacult. res.** V. 32, p. 162–173. 2001.

ANDERSSON L.; PERSSON C. Circumscription of the tribe Cinchoneae (Rubiaceae) – A cladistic approach. **Pl. Syst. Evol.** 178, p. 65–94, 1991.

BARTON B.; BOLLING H.; HAUSKINS B.; JANSEN C. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albuns*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. albuns* x *S.*

platyrhynchus) sturgeos exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. **Comp. Biochem. Physiol.** V. 126, p. 125-134. 2000.

BELO M.; SCHALCH S.; MORAES F.; SOARES V.; OTOBONI A.; MORAES, J. 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.146-54, 2005.

BRANDÃO F.; GOMES L.; CHAGAS E. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amaz.** V. 36, p. 349–356. 2006

CLAUDIANO G.; DIAS NETO J.; SAKABE R. et al. Eficácia do extrato aquoso de "*Terminalia catappa*" em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. **Rev. Bras. Saúde Prod Anim.** V. 10, n. 3, p. 625-636, 2009.

COOK M.; HAYBALL P.; HUTCHINSON W.; NOWAAK B. HAYBALL J. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish Shellfish Immunol.** V. 14, n. 4 p. 333-345. 2003.

EBERLIN S.; DOS SANTOS L.; QUEIROZ M. *Uncaria tomentosa* extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Int Immunopharmacol.** V. 5, n 7-8, p.1235-1246. 2005.

EL-SAYED A. **Tilapia culture.** p. 277. London: Cabi. 2006.

FAJER-ÁVILA, E.J.; PARRA, I.A.; AGUILAR-ZARATE, G.; CONTRERAS-ARCE, R.; ZALDÍVAR-RAMÍREZ, J.; BETANCOURT-LOZANO, M. Toxicity of formalin to

bull's eye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. **Aquacult.** V. 223, p. 41-50. 2003.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture.** p. 197. Rome. 2010.

GATLIN D. Nutrition and fish health. Em: **Fish Nutrition.** Halver J. & Hardy R. (eds.), 3rd edition. London:Academic Press. p. 671-702. 2002.

GILDBERG A.; MIKKELSEN H.; SANDAKER E., RINGO E. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of bacalhau do atlântico (*Gadusmorhua*). **Hydrobiol.** V.352, p.279-285, 1997.

GRAM L.; MELCHIORSEN J.; SPANGGARD B., HUBER I., NIELSEN T. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 65, n. 3, p. 969-9732. 1999.

HEITZMAN M.; NETO C.; WINIARZ E.; VAISBERGB A.; HAMMONDC G. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochem.** V. 66, p. 5-29. 2005.

KEPLINGER K.; LAUS G.; WURM M.; DIERICH M.; TEPPNER H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.—Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **J. ethnopharmacol.** V. 64, p. 23–34. 1999.

KLOUCEK P.; POLESNY Z.; SVOBODOVA B.; VLKOVA E.; KOKOSKA L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. **J. ethnopharmacol.** V. 3, n. 99(2), p. 309-12. 2005.

LI P.; GATLIN D. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future application. **Aquacult.** V. 251, p. 141-152. 2006.

MARIZ S.R.; CERQUEIRA G.S.; ARAÚJO W.C.; DUARTE J.C.; MELO A.F.M.; SANTOS H.B.; OLIVEIRA K.; MELO DINIZ M.F.F.; MEDE I.A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Rev. bras. Farmacogn.** V. 16, n. 3, p. 372-8. 2006.

MARTINS M.; VIEIRA F.; JERÔNIMO G.; MOURIÑO J.; DOTTA G.; SPECK G.; JATOBÁ A.; PEDROTTI F.; BUGLIONE-NETO C.; PEREIRA G. Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Fish Physiol Biochem.** V.35, p. 219-222. 2009.

MASCARENHAS, M.H.T; LARA, J.F.R; MACEDO, G.A.R; VIANA, M.C.M; FREIRE, F.M; KARAM, D. Efeito de culturas antecessoras à cana-de-açúcar na composição florística de plantas daninhas. **Rev. bras. Herbicida.** V. 11, n. 2, p. 241-248. 2012

MORAES F.; MARTINS M. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva, In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M. et al. (Eds). **Tópicos especiais em piscicultura de água tropical intensiva.** São Paulo: TecArt, 2004. p.343-383.

MORAES F.; MORAES J. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo.** Macapá: Embrapa. p. 625-723. 2009.

MUHAMMAD I.; DUNBAR D.; KHAN R.; GANZERA M.; KHAN I. Investigation of Uña de Gato 17-deoxyloganic acid and ¹⁵N NMR spectroscopic studies on pentacyclicoxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Phytochem.** V. 57, p. 781-785. 2001.

NIKOSKELANEN S.; SALMINEN S.; BYLUND G., OUWEHAND A. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. **Appl. Environ Microbiol.** V. 67, n.6, p. 2430-2435. 2001.

PILARSKI F.; CHAGAS E.; VARANDAS D.; SAKABE R. 2009. Effect of B-glucan supplementation in the juvenile *Oreochromis niloticus* vaccinated against *Flavobacterium columnare*: non-specific immune parameters. **J. World Aquacult. Soc.** 2009.

SAKAY M. Current research status of immunostimulants. **Aquacult.** V. 172, n. 63-92. 1999.

SALVADOR R.; TOAZZA C.; MORAES J.; MORAES F. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Dis Aquat Organ.** V. 98, n. 3, p. 235-241. 2012.

SHENG Y.; PERO RW.; WAGNER H. Treatment of chemotherapy induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomed.** V. 7, n. 2, p. 137-143. 2000.

SMITH V.; BROWN J.; HAUTON C. Immunostimulations in crustaceans, does it really protect against infection?. **Fish. shellfish immun.** V. 15, p. 71-90. 2003.

SORUM H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: AARESTRUP. **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.** p. 213-238. 2006.

SURESH A. Tilapia Update. **World Aquacult.** V.30, n.4. 1998.

VAINIKKA A.; JOKINEN E.; KORTET R.; PAUKKU S. PIRHONEN J.; RANTALA M.; TASKINEN J. Effects of testosterone and B-glucan on immune function in tench. **J. Fish Biol.** V. 66, p. 348-361. 2005.

VERSCHUERE L.; ROMBAUT G.; SORGELOOS P. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiol Mol Biol R.** V.64, n.4, p. 655-671. 2000.

ZIMMERMAN S.; FITZMMONS K. Tilapicultura intensiva. Em: CYRINO, J.; URBINATI E.; FRACALLOSSI, D. et al (Eds). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** Campo Belo: Tecart. p. 239-266. 2004.