



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL SUSTENTÁVEL**

DESIELI GOMES DE AMORIN

**EFEITO DO EXTRATO DE ALHO (*Allium sativum*) SOBRE O SISTEMA
HEMATOLÓGICO, IMUNE E METABÓLICO DE JUNDIÁS *Rhamdia quelen*
(Quoy & Gaimard, 1824)**

LARANJEIRAS DO SUL

2016

DESIELI GOMES DE AMORIN

**EFEITO DO EXTRATO DE ALHO (*Allium sativum*) SOBRE O SISTEMA
HEMATOLÓGICO, IMUNE E METABÓLICO DE JUNDIÁS *Rhamdia quelen*
(Quoy & Gaimard, 1824)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável da Universidade Federal da Fronteira Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Luisa Helena Cazarolli

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Silvia Romão.

LARANJEIRAS DO SUL

2016

DGI/DGCI - Divisão de Gestão de Conhecimento e Inovação

AMORIN, DESIELI GOMES DE
EFEITO DO EXTRATO DE ALHO (*Allium sativum*) SOBRE O
SISTEMA HEMATOLÓGICO, IMUNE E METABÓLICO DE JUNDIÁS
Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard, 1824)/ DESIELI GOMES DE
AMORIN. -- 2016.
104 f.:il.

Orientadora: LUISA HELENA CAZAROLLI.

Co-orientador: SILVIA ROMÃO.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Agroecologia
e Desenvolvimento Rural Sustentável (PPGADR), , 2016.

1. Extrato de Alho. 2. *Rhamdia quelen*. 3.
Ichthyophthirius multifiliis. 4. Hematologia. 5.
Bioquímica. I. CAZAROLLI, LUISA HELENA, orient. II.
ROMÃO, SILVIA, co-orient. III. Universidade Federal da
Fronteira Sul. IV. Título.

DESELI GOMES DE AMORIN

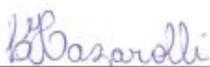
TÍTULO: "EFEITO DO EXTRATO DE ALHO (*Allium sativum*) SOBRE O SISTEMA HEMATOLÓGICO, IMUNE E METABÓLICO DE JUNDIÁS *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)".

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável – PPGADR da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, defendido em banca examinadora em 09/12/2016

Orientador (a): Profª Drª Luisa Helena Cazarolli

Aprovado em: 09 / 12 / 2016

BANCA EXAMINADORA



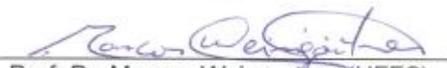
Profª. Drª. Luisa Helena Cazarolli (UFFS)



Profª. Drª. Sílvia Romão (UFFS)



Profª. Drª. Ana Tereza Bittencourt Guimarães (Unioeste)



Prof. Dr. Marcos Weingartner (UFFS)

Laranjeiras do Sul/PR, dezembro de 2016

Dedico este trabalho aos meus pais
Sadi e Delci, por todo o apoio e
dedicação que tiveram por mim ao
longo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, energia e força para superar as dificuldades.

A Universidade Federal da Fronteira Sul e a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável pelos ensinamentos e dedicação.

A minha Orientadora Luisa, pela dedicação, apoio, contribuição e empenho durante todo o período de estudo. Muito obrigada.

A coorientadora Sílvia, por toda a contribuição para com o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores Carlos, Ana Teresa, Gabriela pelas contribuições.

Aos colegas do mestrado, pelo apoio e amizade.

A toda a equipe do laboratório, pelas contribuições e apoio para que esse trabalho fosse desenvolvido, em especial a Maria Alice.

A minha família, que sempre estiveram do meu lado me apoiando durante toda a minha vida. Pai, Mãe, Jaine, Fatima, Sadiel, Thaile, Elivelto e Maria Luiza obrigada de coração por vocês fazerem parte da minha vida.

Ao Junior pelo amor, carinho e apoio na fase final do mestrado.

Ao Ceagro e Coperjunho pelo apoio e oportunidade de conciliar trabalho e estudo.

A família Amarin.

RESUMO

Considerando o cultivo comercial de peixes, diferentes espécies vêm sendo produzidas de forma cada vez mais intensiva, ou seja, com altas densidades de estocagem/m³ de água. Este tipo de cultivo promove condições extremamente estressantes aos animais que podem causar distúrbios em seu estado fisiológico levando à redução do ganho de peso e crescimento, desempenho na reprodução e baixa resistência a patógenos, ficando susceptíveis ao ataque de parasitas, bactérias, vírus e/ou fungos. Diante disso, existe um crescente interesse na busca de soluções alternativas direcionadas à prevenção e/ou à diminuição do risco de transmissão de doenças infecciosas e parasitárias nas populações de peixes saudáveis. São várias as fontes fitoterápicas existentes e que merecem ser estudadas devido aos seus efeitos benéficos já conhecidos e uma delas é o extrato de alho (*Allium sativum*). Embora haja evidências dos benefícios do uso do extrato de alho na aquicultura, existem poucos estudos sobre os efeitos deste extrato em espécies nativas, como por exemplo o *R. quelen*. Existem no Brasil inúmeras espécies de parasitas que causam danos aos peixes, no entanto os protozoários representam um dos grupos de microrganismos que mais causam prejuízos à piscicultura. Neste contexto, um dos fatores limitantes no cultivo do gênero *Rhamdia* é a presença do protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, principalmente na fase de alevinagem, o qual ocasiona a doença conhecida como ictioftiríase, também conhecida como doença dos pontos brancos ou ictio. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação da ração com extrato de alho (*Allium sativum*) sobre a fisiologia, o sistema hematológico, imune e metabólico de Jundiás (*Rhamdia quelen*) e na resistência de animais submetidos ao desafio com o parasita *Ichthyophthirius multifiliis* em condições controladas em laboratório. Foram utilizados 80 alevinos de *R. quelen*, distribuídos em oito aquários com 10 peixes cada, os mesmos foram alimentados duas vezes ao dia com dietas contendo 0%, 0,5%, 2,5% e 5% de extrato seco de alho. Após 77 dias de alimentação suplementada com extrato de alho, metade dos animais (n = 10) de cada grupo de tratamento e controle foram submetidos ao desafio com o parasita *Ichthyophthirius multifiliis*, mantendo a ração suplementada. A outra metade dos animais (n = 10) dos grupos de tratamento e controle foi mantida no sistema de circulação original recebendo a suplementação dietética. O uso do extrato de alho na ração não promoveu alterações significativas na glicemia, conteúdo de glicogênio hepático, atividades das aminotransferases teciduais e plasmáticas e nos níveis de peroxidação lipídica tecidual. Por outro lado, estimulou a síntese de glicogênio muscular e promoveu redução da atividade da catalase hepática. Em termos de avaliação hematológica e imune, o uso do extrato de alho aumentou o número de hemácias, mas reduziu o conteúdo de hemoglobina. Ainda, não foi capaz de alterar o número total de leucócitos e trombócitos, mas promoveu aumento do número de basófilos e reduziu a contagem de monócitos dos animais. Além disso, não promoveu alterações nos conteúdos de lisozima e nitrito/nitrato plasmáticos. Pode-se concluir que a suplementação da dieta com extrato de alho na ração não influencia na homeostasia metabólica basal dos animais. Ainda, o extrato de alho não atuou como promotor de crescimento para os juvenis de jundiá e não promoveu alterações na capacidade de resposta imune ou hemtalógica basal dos peixes, não melhorando a resistência frente à

infestação com o parasita *I. multifiliis*. Ainda existem poucos estudos em relação ao uso do alho na ração, em especial com o *R. quelen*, ressaltando a necessidade de mais pesquisas envolvendo doses, tempos de tratamento e diferentes fases de desenvolvimento para caracterizar adequadamente os efeitos do alho no metabolismo, no sistema imune do jundiá e na sua capacidade de resposta frente à agentes patogênicos diversos como parasitas e bactérias.

Palavras-chave: *Ichthyophthirius multifiliis*. Extrato de Alho. Hematologia. Bioquímica. *Rhamdia quelen*.

ABSTRACT

Considering the commercial fish production, different species have been produced in an intensive way with high storage densities / m³ of water. This type of cultivation promotes extremely stressful conditions to the animals causing disturbances in their physiological state. This condition can lead to reduced weight gain and growth, reproduction performance and low resistance to pathogens, being susceptible to attack by parasites, bacteria, viruses and / or fungi. Taking these into account, there is a growing interest in the search for alternative solutions that can prevent and / or reduce the risk of transmission of infectious and parasitic diseases in healthy fish populations. There are several existing herbal sources that deserve to be studied due to their potential beneficial effects and one of them is the garlic extract (*Allium sativum*). Although there is evidence of the benefits of using garlic extract in aquaculture, there are few studies on the effects of this extract on native species such as *R. quelen*. In Brazil, there are several species of parasites that can damage fishes, however protozoan represent one of the most damaging group of microorganisms to fish farming. In this context, one of the limiting factors in the cultivation of *Rhamdia* sp. is the presence of the ciliated protozoan *Ichthyophthirius multifiliis*, mainly in the stage of raising, which causes the disease known as ichthyophthyiasis, also known as white dot disease or ictio. The objective of this study was to evaluate the effect of dietary supplementation with garlic extract (*Allium sativum*) on the physiology, hematological, immune and metabolic systems of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and the animal's resistance to the parasite *Ichthyophthirius multifiliis* under controlled conditions in the laboratory. A total of 80 *R. quelen*, distributed in eight aquariums with 10 fish each one, were fed twice daily with diets containing 0%, 0.5%, 2.5% and 5% of dry garlic extract. After 77 days of feeding supplemented with garlic extract, half of the animals (n = 10) of each treatment and the control group were submitted to the challenge with the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*, maintaining the feed supplemented. The other half of the animals (n = 10) of the treatments and control groups were maintained in the original circulation system receiving dietary supplementation. The use of garlic extract in the diet did not promote significant changes in glycemia, hepatic glycogen content, tissue and plasma aminotransferases activities, and tissue lipid peroxidation levels. On the other hand, it stimulated the synthesis of muscle glycogen and promoted a reduction of hepatic catalase activity. In terms of hematological and immune systems, the use of garlic extract increased the number of red blood cells but reduced hemoglobin content. Furthermore, it was not able to change the total number of leukocytes and thrombocytes, but it promoted an increase in the number of basophils and reduced the monocyte count of the animals. Also, the garlic supplemented diets were not able to change the plasma lysozyme and nitrite/nitrate levels. It can be concluded that dietary supplementation with garlic extract does not influence the basal metabolic homeostasis of the animals. Furthermore, garlic extract did not act as a growth promoter for silver catfish juveniles and did not promote changes in the basal immune or hematological response capacities of the fishes and did not improve the resistance to the infestation with the *I. multifiliis*. Still, there are few studies regarding the use of garlic in the diet, especially to *R. quelen*, reinforcing that further studies are necessary involving doses, treatment periods and different stages of animals's

development to adequately characterize the effects of garlic on metabolism, hematological and immune systems of silver catfish and its ability to react to diverse pathogens such as parasites and bacteria.

Keywords: *Ichthyophthirius multifiliis*. Garlic extract. Hematology. Biochemistry. *Rhamdia quelen*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fases do ciclo de vida do parasita <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	29
Figura 2 – Planta inteira de Alho (<i>Allium sativum</i>)	39
Figura 3 – Sistema de recirculação de água	42
Figura 4 - Fluxograma dos tratamentos e do desafio com o parasita	46
Figura 5 – Fluxograma das avaliações hematológicas, imunes, bioquímicas e histológicas	51
Figura 6 – (A) Glicemia de <i>R. quelen</i> .; (B) Conteúdo de glicogênio hepático e (C) Conteúdo de glicogênio muscular de <i>R. quelen</i> após período de tratamento com diferentes concentrações de extrato de alho	56
Figura 7 – Atividade da aspartato-aminotransferase (AST) no rim (A), baço (B), músculo (C) e fígado (D) de jundiás	58
Figura 8 – Atividade da alanina-aminotransferase (ALT) no rim (A), baço (B), músculo (C) e fígado (D) de jundiás	60
Figura 9 – Níveis de lisozima plasmática de <i>R. quelen</i> após tratamento com diferentes concentrações de extrato de alho	72
Figura 10 - Conteúdo de nitrito/nitrato (μM) no plasma de <i>R. quelen</i> suplementados com diferentes concentrações de extrato de alho na ração	73
Figura 11 – Contagem do número de parasitas (<i>I. multifiliis</i>) por juvenil de <i>R. quelen</i> (A) na superfície da pele (10 cm^2); (B) no segundo arco branquial	76
Figura 12 – Juvenil de <i>R. quelen</i> infestado pelo parasita <i>I. multifiliis</i> (pontos brancos)	76
Figura 13 – (A) <i>R. quelen</i> do grupo controle, desafiado com o parasita,	78

com possível infecção bacteriana; (B) *R. quelen* que recebeu dieta com extrato de alho, desafiado com o parasita, porém sem infecção secundária

Figura 14 – Histologia representativa de brânquia normal de *R. quelen* não desafiado com o parasita 80

Figura 15 – Histologia representativa de Brânquia normal de peixe não desafiado com o parasita em menor (A) e maior detalhe (C e E); Histologia representativa de Brânquia de peixe desafiado com o parasita em menor (B) e maior detalhe (D e F) 81

Figura 16 – Histologia representativa de brânquia de Jundiá (A) Desestruturação das lamelas secundárias; (B) Desestruturação e fusão de lamela secundária 82

Figura 17 – Histologia normal de tegumento de *R. quelen* não desafiado com o parasita 84

Figura 18 - Histologia representativa do tegumento de Jundiá (A) Tegumento normal de peixe não desafiado com o parasita; (B) Tegumento de peixe com alteração na sua estrutura ocasionados pelo parasita *I. multifilis* e proliferação de “club cels”; (C) Epiderme e derme normal sem alterações; (D) Alteração da epiderme ocasionada pelo parasita *I. multifilis* e proliferação de “club cels” 85

Figura 19 – Histologia representativa do tegumento de Jundiá (A) Migração leucocitária na derme; (B) *I. multifiliis* parasitando o tegumento (epiderme) e grande proliferação de “club cells” 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros da qualidade da água durante o período experimental para o sistema de circulação	52
Tabela 2 - Parâmetros de biometria total inicial e final de <i>R. quelen</i> submetidos a dieta com diferentes concentrações de extrato de alho	53
Tabela 3 – Consumo médio de ração por <i>R. quelen</i> durante o período experimental	53
Tabela 4 – Atividade da AST e ALT no plasma de <i>R. quelen</i>	63
Tabela 5 - Atividade da Catalase (mmol de peróxido de hidrogênio degradado.mg ⁻¹ de proteína.min ⁻¹) nos tecidos (fígado, rim e baço) de <i>R. quelen</i>	64
Tabela 6 – Lipoperoxidação – LPO (nmol de MDA/mg de proteína) em tecidos (baço, fígado, rim e músculo) de <i>R. quelen</i>	65
Tabela 7 - Variáveis hematológicas de <i>R. quelen</i> submetidos à dieta com diferentes concentrações de extrato de alho	67
Tabela 8 – Contagem total de leucócitos e trombócitos e contagem diferencial de células de defesa do sangue de <i>R. quelen</i>	70
Tabela 9 – Parâmetros da qualidade da água durante o período do desafio com o parasita para o sistema de circulação	74
Tabela 10 – Taxa de sobrevivência e mortalidade dos peixes desafiados com o parasita <i>I. multifiliis</i>	75
Tabela 11 – Contagem de leucócitos e trombócitos totais e contagem diferencial de células de defesa do sangue de <i>R. quelen</i> após o desafio com o parasita <i>I. multifiliis</i>	79

LISTA DE SIGLAS

ALT - Alanina Aminotransferase
AST - Aspartato Aminotransferase
ATP – Adenosina Trifosfato
C – Controle (Testemunha)
CAT- Catalase
CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CO₂ - Dióxido de Carbono
CPF – Comprimento Padrão Final
CPI – Comprimento Padrão Inicial
CTF – Comprimento Total Final
CTI – Comprimento Total Inicial
ERN - Espécie reativa de nitrogênio
FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
GOT/TGO – Transaminase glutâmico-oxalacética
GP – Ganho de Peso
GPT/TGP - Transaminase glutâmico-pirúvica
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HCl – Ácido clorídrico
HCM - Hemoglobina Corpuscular Média
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN – Instrução Normativa
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
MDA – Malondialdeído
MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura
NaCl – Sal comum
NH₃ – amônia
NO – Óxido Nítrico
NO₂⁻ – nitrito
NO₃⁻ – nitrato

NOS – Enzima NO sintase

O₂ – Oxigênio

OH[•] – Radical hidroxil

PBS – Tampão Fosfato Salina

Pfi – Peso final

Pin – Peso inicial

T1 – Tratamento 1

T2 – Tratamento 2

T3 – Tratamento 3

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido Tricloroacético

TCP – Taxa de Comprimento Padrão

TCT – Taxa de Comprimento Total

UFFS – Universidade Federal da Fronteira Sul

VCM - Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.1.1	Objetivos Específicos.....	21
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
3.1	DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA.....	22
3.2	ASPECTOS DA BIOLOGIA DO JUNDIÁ (<i>Rhamdia quelen</i>).....	25
3.3	PATOLOGIA	27
3.4	SISTEMA HEMATOLÓGICO, IMUNE E METABÓLICO DOS PEIXES	30
3.4.1	Sistema Hematológico e Imune	30
3.4.2	Sistema Metabólico.....	33
3.5	EXTRATO VEGETAL DE ALHO (<i>Allium sativum</i>)	37
4	METODOLOGIA	41
4.1	MATERIAIS	41
4.2	SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO	41
4.3	ANIMAIS.....	43
4.4	<i>Allium sativum</i> E DIETAS EXPERIMENTAIS	43
4.5	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS	44
4.6	DESAFIO COM <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	44
4.7	COLETA DE SANGUE E PREPARO DE PLASMA.....	46
4.8	COLETA DE TECIDOS	47
4.9	NÍVEIS DE LISOZIMA PLASMÁTICA	47
4.10	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO	48

4.11	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO.....	48
4.12	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS	48
4.13	ATIVIDADE DA CATALASE	49
4.14	LIPOPEROXIDAÇÃO - LPO	49
4.15	HISTOLOGIA	50
4.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	PARTE 1 – PEIXES NÃO DESAFIADOS COM O PARASITA <i>Ichthyophthirius</i>	
<i>multifiliis</i>	52	
5.1.1	Sistema de Recirculação Fechado e Parâmetros de Qualidade de Água ...	52
5.1.2	Parâmetros de Sobrevivência e Crescimento	52
5.1.3	Parâmetros Bioquímicos.....	55
5.1.4	Parâmetros Hematológicos.....	66
5.1.5	Parâmetros Imunes.....	71
5.2	PARTE II – PEIXES DESAFIADOS COM O PARASITA <i>Ichthyophthirius</i>	
<i>multifiliis</i>	74	
5.2.1	Parâmetros de Qualidade de Água	74
5.2.2	Parâmetros de Sobrevivência e Contagem dos Parasitas Infestados	74
5.2.3	Parâmetros Hematológicos.....	78
5.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	79
5.3.1	Análise Histológica de Brânquias	79
5.3.2	Análises Histológicas do Tegumento.....	83
6	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade que vem crescendo muito nos últimos anos e, provavelmente, é um dos setores de produção de alimentos que mais cresce no mundo (FAO, 2014). Praticada em vários países, a aquicultura é uma atividade importante que fornece proteína animal, cumprindo, assim, um papel relevante em relação à segurança alimentar (IBGE, 2013). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) a aquicultura atingiu recorde na produção no ano de 2014, sendo de 73,8 milhões de toneladas (FAO, 2016).

Um dos fatores do aumento da aquicultura é a diminuição ou estagnação do setor pesqueiro, ou seja, de extração de espécies do meio ambiente natural por meio da pesca. Tal fato promove a redução dos estoques naturais e, conseqüentemente, da diversidade de espécies aquáticas. No entanto, apesar da estagnação da pesca e do crescimento da aquicultura nos últimos anos, a produção pesqueira extrativista mundial foi de 93,4 milhões de toneladas em 2014, sendo que 11,9 milhões são de águas continentais (FAO, 2016).

Outro fator é a demanda por proteína animal, em especial o pescado, que vem aumentando de forma significativa em nível mundial nos últimos anos. Segundo dados da FAO (2016) o consumo mundial de pescado per capita aumentou em média de 9,9 kg em 1960, para 19,7 kg em 2013, fato esse relacionado com o aumento populacional, melhores condições de renda e a busca por alimentos mais saudáveis.

Em termos de produção aquícola, o Brasil está entre os 25 países com maior produção do mundo (ocupando o 14º lugar), sendo esses responsáveis por 97,1% da produção em 2014 (FAO, 2016). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2015), a piscicultura brasileira produziu em 2015, 483,24 mil toneladas, representando um aumento de 1,5% em relação ao ano anterior. Dentre todos os estados brasileiros, o estado do Paraná é considerado o segundo com maior produção de peixes do Brasil, sendo 13% do total (IBGE, 2015).

Considerando o cultivo comercial de peixes, diferentes espécies vêm sendo produzidas de forma cada vez mais intensiva, ou seja, com altas densidades de estocagem. Este tipo de cultivo promove condições

extremamente estressantes aos animais que podem causar distúrbios em seu estado fisiológico levando à redução do ganho de peso e crescimento, desempenho na reprodução e baixa resistência a patógenos, ficando suscetíveis ao ataque de parasitas, bactérias, vírus e/ou fungos (URBINATI; CARNEIRO, 2004; BALDISSEROTTO et al., 2010).

O cultivo de espécies nativas de peixes no Brasil vem ganhando importância no cenário da aquicultura, uma vez que representa uma alternativa de grande valor econômico e ecológico. Em função disto, o Jundiá (*Rhamdia quelen*) é considerado uma das espécies de peixes nativos com grande potencial para o cultivo intensivo, com expressiva produção na região Sul do Brasil, por apresentar tolerância a baixas temperaturas, crescimento rápido, boa eficiência alimentar, resistência ao manejo, docilidade e facilidade de adaptação por alimentos (GOMES et al., 2000; BALDISSEROTTO, 2004). Apresenta ainda boa aceitação no mercado consumidor por não apresentar espinhos intramusculares além da qualidade e carne saborosa (LIMA; BERGAMIN; MORO, 2013).

Mesmo que o jundiá seja considerado uma espécie nativa promissora para a piscicultura, a intensificação do cultivo comercial pode oferecer condições propícias à introdução e disseminação de doenças, e, conseqüentemente, causar prejuízo para o produtor. Durante o processo de cultivo, os peixes são constantemente submetidos a diferentes procedimentos de manejo e variações ambientais, que podem alterar o equilíbrio orgânico e podem levar a alterações em seu metabolismo, comprometendo sua imunidade. Sabe-se que alterações no sistema imune de peixes provocados por agentes externos estão diretamente associadas à significativa redução na sua resistência a doenças.

As principais doenças em jundiás ocorrem devido às variações da temperatura, altas densidades nos cultivos, alimentação inadequada e tratamentos de forma errônea, deixando-os assim, mais vulneráveis ao desenvolvimento de doenças (BRANDÃO, 2004). O mesmo autor descreve que os principais agentes causadores das doenças são bactérias (80% dos casos), parasitas (8,3% dos casos), dentre outros, como vírus, fungos e também o fator nutricional. Sendo assim, é de grande importância a adoção de técnicas e métodos que venham a aumentar a resistência dos peixes às doenças e sua

capacidade de resposta às situações estressantes, por meio da modulação de seu sistema imune e metabólico.

Em sistemas convencionais de produção aquícola, quando há casos de parasitoses, os tratamentos indicados são produtos químicos, como a formalina, sulfato de cobre, verde malaquita, cloramina, pesticidas organofosforados e diflubenzuron (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2010). Já para o tratamento de infecções bacterianas, segundo os mesmos autores supracitados, são usados antibióticos, como a oxitetraciclina. Os resíduos desses produtos podem acumular na musculatura dos peixes, oferecendo risco potencial ao consumidor, além do efeito tóxico ocasionado aos tecidos dos peixes, como brânquias, tegumento e fígado (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2010). Vale ressaltar também, que o uso de drogas terapêuticas pode ocasionar grandes impactos ambientais, associado aos resíduos químicos na água, bem como a seleção de organismos resistentes (como bactérias, vírus ou parasitas).

Neste cenário, a aquicultura ecológica ou agroecológica surge como alternativa ao modelo convencional de produção, buscando novas formas para o controle de enfermidades. Em sistemas orgânicos e/ou agroecológicos de produção aquícola a Instrução Normativa nº 28¹ (2011) estabelece normas técnicas para os Sistemas Orgânicos de Produção Aquícola, não permitindo o uso de produtos químico-sintéticos. Diante disso, existe um crescente interesse na busca de soluções alternativas direcionadas à prevenção e/ou à diminuição do risco de transmissão de doenças infecciosas e parasitárias nas populações de peixes saudáveis. Assim, diversos fitoterápicos e compostos derivados de plantas e animais têm sido empregados na prevenção de enfermidades em peixes sendo que uma das formas é a suplementação destes compostos nas rações. São várias as fontes fitoterápicas existentes e que merecem ser estudadas devido aos seus efeitos benéficos já conhecidos e uma delas é o extrato de alho (*Allium sativum*).

Estudos científicos identificaram que o alho, além de possuir vários nutrientes, tem ação antiinflamatória, antisséptica, antimicrobiana, antifúngica,

¹ Normas técnicas para a produção aquícola orgânica.

² O sistema complemento compreende um grupo de aproximadamente 35 proteínas envolvidas nas respostas imunes inespecíficas e específicas.

³ A utilização do verde de malaquita é considerado o tratamento mais eficaz para esta

antiviral, anticarcinogênica, antibiótica e antioxidante, ajudando também na desintoxicação hepática e renal e no aumento da capacidade do sistema imune (TOMAZ; CAMPOS, 2012; MONTEIRO; PACHÚ; DANTAS, 2008).

Embora haja evidências dos benefícios do uso do extrato de alho na aquicultura, existem poucos estudos sobre os efeitos deste extrato em espécies nativas, como por exemplo na espécie *R. quelen*. Diante disto, as investigações relativas ao efeito do extrato de alho em Jundiá representam uma alternativa para a substituição do uso de antibióticos e quimioterápicos no tratamento de doenças infecciosas e/ou parasitárias, melhorando a condição de saúde dos peixes e reduzindo os potenciais danos ao meio ambiente, ao consumidor e potencializando a produção orgânica e/ou agroecológica. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação da ração com extrato de alho (*Allium sativum*) em Jundiás e a resistência dos animais submetidos ao desafio com o parasita *Ichthyophthirius multifiliis*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação da ração com extrato de alho (*Allium sativum*) sobre a fisiologia, o sistema hematológico, imune e metabólico de Jundiás (*Rhamdia quelen*) e na resistência de animais submetidos ao desafio com o parasita *Ichthyophthirius multifiliis* em condições controladas em laboratório.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da ração suplementada com diferentes concentrações de extrato de alho (tratamento *in vivo*) em jundiás:
 - Sobre parâmetros hematológicos (contagem de células eritrocitárias e leucocitárias) do sangue;
 - Sobre parâmetros imunes (lisozima, conteúdo de nitrito/nitrato) do sangue;
 - Sobre parâmetros bioquímicos no sangue e em tecidos (fígado, rim, músculo esquelético e baço) (glicemia, conteúdo de glicogênio, atividade de aminotransferases, capacidade antioxidante);
 - Sobre parâmetros histológicos em brânquia e tegumento de Jundiá;
- Determinar a concentração do extrato de alho mais eficaz na suplementação da ração para Jundiás após tratamento *in vivo* considerando as respostas fisiológicas dos sistemas hematológico, imune e metabólico;
- Avaliar a resistência e a resposta fisiológica através de parâmetros hematológicos e histológicos de jundiás suplementados com extrato de alho após desafio com o parasita *Ichthyophthirius multifiliis in vivo*;
- Avaliar os parâmetros zootécnicos dos jundiás suplementados com extrato de alho;
- Verificar a ocorrência de infecções secundárias nos animais desafiados ocasionadas pela presença do parasita *Ichthyophthirius multifiliis* após suplementação com diferentes concentrações de extrato de alho *in vivo*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA

Dentre as diversas atividades desenvolvidas no decorrer do processo de desenvolvimento da agricultura tem-se a aquicultura, que embora seja uma atividade milenar, em escala comercial é recente, quando comparada com outras atividades de produção animal, como frangos, suínos e gado. Diante das limitações da expansão da pesca (extração de organismos aquáticos do meio natural), a qual vem diminuindo nos últimos anos devido à redução dos estoques naturais (SIDONIO et al., 2012), a aquicultura torna-se uma alternativa importante para suprir a demanda por pescados, e vem aumentando bastante sua participação no total de produção de pescados no mundo e gerando grandes lucros para o setor.

A aquicultura é uma das atividades que vem crescendo mundialmente a cada ano, com uma produção de 73,8 milhões de toneladas no ano de 2014 (FAO, 2016). É uma atividade encontrada em diversos países, sendo que o Brasil ocupa uma posição de destaque entre os principais países com produção aquícola significativa, ainda que a produção mais expressiva seja encontrada nos países Asiáticos (FAO, 2016). A aquicultura no Brasil apresentou grande crescimento nos últimos anos, devido aos métodos de intensificação do cultivo (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014). Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA (2014), o Brasil produziu em 2011 aproximadamente 1,4 milhões de toneladas de pescados. Destes, mais de 628 mil toneladas foram de organismos cultivados, representando um aumento de 31% em relação ao ano de 2010, sendo que a aquicultura continental apresentou maior produção comparada à marinha, com mais de 86% do total (MPA, 2011). Percebe-se que é uma atividade promissora, pois a procura do pescado vem aumentando ano a ano, fator este relacionado, entre outros motivos, à busca por uma alimentação mais saudável.

O Brasil possui um enorme potencial para a aquicultura, pois possui 12% da água doce disponível do planeta, um litoral de mais de oito mil quilômetros e ainda uma faixa marítima equivalente ao tamanho da Amazônia (MPA, 2014). Ainda, segundo dados do MPA é possível com o aproveitamento de apenas

uma fração dessa lâmina d'água, obter uma grande produção de organismos aquáticos como peixes, crustáceos, moluscos, algas entre outros, lógico que de forma controlada e sustentável para que não cause desequilíbrio ambiental.

Ainda, verifica-se uma tendência de os sistemas de cultivos na aquicultura seguirem modelos de produção similares aos já existentes para outras espécies animais, ou seja, a intensificação e maximização cada vez maior dos sistemas de produção, passando do extensivo para o superintensivo e cada vez mais tecnificada. Desta forma, o sistema de produção se torna altamente dependente do mercado, de empresas e do sistema de crédito, diminuindo sua sustentabilidade, tanto para o pequeno produtor como para o meio ambiente. O fato é que, quanto mais industrializado e mecanizado for o sistema de produção, mais dependente de crédito se torna o produtor (DELGADO, 2012).

Assim como na agricultura vem se observando uma padronização da produção e conseqüentes reduções de biodiversidade (CARVALHO, 2013), na aquicultura também se verifica fenômeno semelhante, pois no Brasil apesar de apresentar a maior diversidade de espécies de peixes de água doce do mundo (MMA, 1998), a principal espécie de peixe produzida no Brasil é exótica, sendo a tilápia (*Oreochromis niloticus*), com 219,33 mil toneladas despescadas em 2015, representando 45,4% do total da despesca nacional (IBGE, 2015).

Os sistemas de produção na aquicultura, quanto à sua intensificação na produção, vão desde o extensivo, semi-intensivo, intensivo e o superintensivo. Compreende os sistemas de produção:

- Sistema extensivo - se caracteriza por aproveitar a infraestrutura já existente como açudes, represas ou barragem e com baixa densidade de estocagem, alimentação natural (oriunda do próprio meio de cultivo como fito e zooplâncton) e conseqüentemente baixa produtividade, porém com pouquíssimo custo de produção e suscetibilidade à doenças bastante reduzida (LIMA, 2013).

- Sistema semi-intensivo – suporta maiores densidades de estocagem que o extensivo e na alimentação além da natural é necessário o fornecimento de ração balanceada. Com o aumento da densidade, há maior produtividade e também mais custos de produção e aumenta-se a suscetibilidade dos animais a doenças (LIMA, 2013).

- Sistema Intensivo – apresenta maior intensificação do manejo de produção e tecnologias, altas densidades de estocagens, dependência de alimento artificial. Além disso, maiores trocas de água são necessárias devido ao grande volume de resíduos liberados. Possui maior produtividade no entanto, com maiores custos de produção e surtos de doenças podem afetar rapidamente todos os peixes do cultivo devido às densidades utilizadas (LIMA, 2013).

- Sistema superintensivo – Possui características similares ao intensivo, no entanto com montante maior de investimentos em tecnologias, mão de obra especializada, altas densidades de estocagens, monocultivo, animais geneticamente superiores, alimentos artificiais de alta qualidade, grande produtividade e maiores custos de produção (RIBEIRO; COSTA; ROSA, 2010; LIMA, 2013).

O desenvolvimento e a alta produção da aquicultura nos últimos anos têm gerado grandes lucros para o setor, porém, ao mesmo tempo, quanto mais intensivo for o sistema de produção mais impactos causam ao ambiente, pois a maioria dos empreendimentos de aquicultura descarregam os efluentes dos ambientes de cultivo no meio natural sem nenhum tipo de tratamento, ocasionando muitas vezes a eutrofização dos sistemas naturais (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2007; VINATEA, 2010). Além disso, observa-se também escapes de espécies exóticas para o ambiente natural, destruição de manguezais para a construção de viveiros (para a produção de camarão, por exemplo) (BOYD, 2003), entre outros impactos causados pela grande densidade dos cultivos que podem comprometer o estado de saúde dos organismos aquáticos, independentemente do sistema de produção aumentando assim, as infecções e disseminação de doenças (IWASHITA; MACIEL, 2013).

Procedimentos intensivos com altas densidades de estocagens levam ao aparecimento de diversas enfermidades, bem como ao uso indiscriminado de quimioterápicos e antibióticos (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014). Em sistemas convencionais de produção aquícola, quando há casos de doenças provocadas por patógenos, os tratamentos indicados são produtos químicos. Os resíduos desses produtos podem acumular na musculatura dos peixes, oferecendo risco potencial ao consumidor, além do efeito tóxico ocasionado

aos tecidos dos peixes, como brânquias, tegumento e fígado. Vale ressaltar também, que o uso de fármacos ou substâncias químicas pode ocasionar grandes impactos ambientais, associado a resíduos químicos na água, bem como a seleção de organismos resistentes (como bactérias, vírus ou parasitas) (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2010).

Frente à necessidade do desenvolvimento da aquicultura como atividade econômica e ambientalmente sustentável, a aquicultura orgânica e/ou agroecológica surge como alternativa ao modelo convencional de produção. Nesse sistema é possível produzir alimentos saudáveis, ter a diversificação da produção, além de atender questões sociais, culturais, de soberania alimentar e de qualidade de vida das pessoas. Porém, ainda existem poucos estudos e experiências na produção aquícola agroecológica.

Nesse sentido de desenvolvimento, a aquicultura pode buscar na academia as bases científicas para contribuir com o desenvolvimento sustentável e agroecológico, sempre visando integrar e compreender os saberes dos agricultores com os conhecimentos de diferentes ciências. Através desta interação, é possível fazer uma análise crítica para compreender o atual modelo do desenvolvimento, no caso da aquicultura, e com esses parâmetros, estabelecer novas estratégias para o desenvolvimento de uma aquicultura mais sustentável.

Em função disto, existe a necessidade de se estudar e criar técnicas que facilitem a produção, principalmente de espécies nativas, que apresentam grande potencial tanto de produção como de comercialização. Na região Sul do Brasil, destaca-se o Jundiá (*Rhamdia* sp) como sendo uma espécie nativa que vem chamando a atenção em função de seu grande potencial de produção e boa aceitação no mercado consumidor. Porém, por se tratar de uma espécie nativa, ainda é necessário o desenvolvimento de pesquisas para melhorar a sua produção, principalmente em relação à sua propensão à doenças provocadas por parasitas, os quais causam grandes prejuízos no cultivo.

3.2 ASPECTOS DA BIOLOGIA DO JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

O peixe conhecido como jundiá, compreende diferentes espécies do gênero *Rhamdia*. A espécie *Rhamdia quelen* é nativa do Brasil e tem ampla distribuição nas Américas, sendo encontrado desde o sudeste do México até o

centro da Argentina (BALDISSEROTO, 2004). Porém a sistemática do gênero é confusa desde que foi descrita, mas segundo Bockmann, Guauzzilli, (2003) o gênero *Rhamdia* pertence à Classe *Actinopterygii*, Ordem *Siluriformes*, Família *Heptapteridae*. Na Bacia do Rio Iguaçu encontram-se duas espécies de jundiá o *Rhamdia branneri* e *Rhamdia voulezi*, ambos foram considerados sinônimos de *R. quelen* por Silvergrip (1996), porém, Baumgartner et al. (2012) validaram o *R. branneri* e *R. voulezi* como não sendo sinônimos de *R. quelen*, levando em consideração o alto grau de endemismo da ictiofauna da bacia do Rio Iguaçu, confirmando com estudos genéticos, os quais apontaram diferenças cariotípicas entre as espécies desta bacia.

O Jundiá é um peixe de couro de cor acinzentada, com hábito alimentar variado, sendo que na fase larval se alimenta de zooplâncton, já quando adultos são onívoros, com tendência à piscívoros (BALDISSEROTO, 2004), característica esta que contribui para sua adaptação ao alimento artificial. Segundo os mesmos autores, em ambiente natural a maioria das espécies do gênero *Rhamdia* preferem ambientes de águas lênticas, com fundo de areia e lama, próximos às margens e à vegetações. À noite saem à procura de alimentos, sendo que durante o dia escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos (GUEDES, 1980). Piaia et al. (1999) observou que larvas e alevinos dessa espécie em cativeiro tem uma acentuada aversão à luz e busca por locais escuros.

O jundiá se caracteriza por resistir a amplas variações em diversos parâmetros de qualidade de água. Considerado uma espécie estenosalina, o jundiá suporta até 9,0 g/L de sal comum (NaCl) por 96h, o que indica que o tratamento de doenças com sal comum poderia ser utilizado nesta espécie sem problemas (MARCHIORO, 1997). Segundo o mesmo autor, os alevinos suportam uma variação de pH na faixa de 4,0 a 8,5. O crescimento dos alevinos é rápido, pois podem atingir aproximadamente 5 cm de comprimento padrão com 30 dias de idade em sistemas artificiais, com crescimento mais significativo nos exemplares expostos à escuridão do que nos expostos continuamente à luz ou ao fotoperíodo normal (GOMES et al., 2000). O nível ideal de oxigênio para a espécie deve ficar acima de 5,0 mg/L para haver um bom desempenho no crescimento, quando esse nível for abaixo de 1,6 mg/L ocorre mortalidade (BRAUN et al., 2006).

Mesmo o jundiá sendo considerado um peixe rústico, são animais que cultivados sob condições intensivas e sujeitos à estresses ambientais se tornam mais propensos ao desenvolvimento de doenças, especialmente as que afetam o tegumento e as brânquias, pois não possuem escamas, que fazem parte da primeira defesa contra os patógenos (BAGLIOLI, 2008).

3.3 PATOLOGIA

A maioria das doenças em jundiás ocorre na primavera, em função das temperaturas mais baixas do outono e inverno provocarem reduções nas taxas metabólicas e de alimentação, bem como na capacidade de reações imunes dos animais. Assim, na saída do inverno e durante a primavera os animais encontram-se enfraquecidos e mais susceptíveis à doenças (BRANDÃO, 2004). O mesmo autor ainda descreve que os principais agentes causadores das doenças são bactérias (80% dos casos), parasitas (8,3% dos casos), dentre outros como vírus, fungos e fatores nutricionais. As doenças ocorrem principalmente devido às condições de cultivo a que os animais são submetidos como altas densidades de estocagem, alimentação inadequada e tratamentos de forma errônea, deixando os animais mais vulneráveis ao ataque e infestações de parasitas, bactérias, fungos, entre outros.

Existem no Brasil inúmeras espécies de parasitas que causam danos aos peixes, no entanto os protozoários representam um dos grupos de microrganismos que mais causam prejuízos à piscicultura, devido principalmente ao fato de que sua reprodução é muito eficiente quando em ambiente favorável (ONAKA; MORAES, 2004). Como são organismos comensais podem estar presentes normalmente em pequena quantidade nos peixes sem causar quaisquer danos, mas se houver desequilíbrio no ambiente de cultivo, por algum tipo de estresse ou manejo inadequado dos peixes, os parasitas podem se desenvolver e tornarem-se patogênicos (ONAKA; MORAES, 2004; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

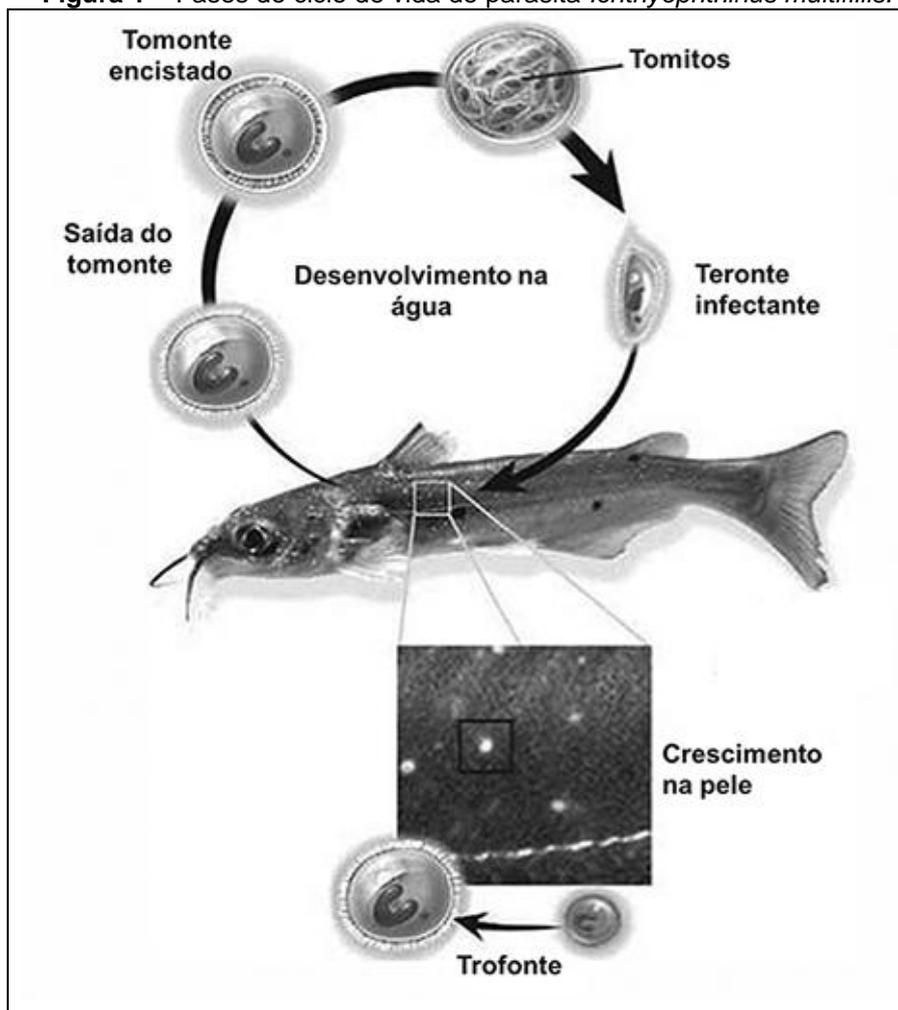
Neste contexto, um dos fatores limitantes no cultivo do gênero *Rhamdia* é a presença do protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, principalmente na fase de alevinagem, o qual ocasiona a doença conhecida como ictioftiríase, também conhecida como doença dos pontos brancos ou ictio (VARGAS et al., 2008).

O *I. multifiliis* é um ectoparasita do grupo dos cilióforos, localizando-se na epiderme e brânquias dos peixes (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008). O ataque do parasita e o desenvolvimento da doença ocorrem principalmente quando se observam oscilações bruscas de temperatura no ambiente de cultivo, a qual gera estresse nos peixes, reduzindo a capacidade de defesa e facilitando a infestação e conseqüentemente ocasionando grande mortalidade dos peixes se não tratada. Este protozoário é responsável pelos maiores prejuízos da piscicultura de água doce a nível mundial, causando grandes prejuízos econômicos (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

O tempo necessário para que o parasita complete o ciclo de vida depende da temperatura, sendo de 3 a 4 dias à 21-24 °C e de 10 a 14 dias à 15 °C (EIRAS, et al., 2010). Segundo Pádua et al. (2013) o parasita *I. multifiliis* tem o ciclo de vida direto, ou seja, necessita de apenas um hospedeiro, porém tem três estágios distintos (Figura 1), sendo:

- Teronte: estágio infectante ao hospedeiro, nessa fase possui forma pequena de dimensões em torno de 30 x 50 µm, com natação aquática livre penetra através do muco e invade o epitélio da pele, brânquias, entre outros e quando entra no hospedeiro se transforma em trofante;
- Trofante: é o estágio em que realiza o parasitismo no epitélio do peixe, podendo atingir 800 a 1000 µm de diâmetro e move-se ativamente dentro do epitélio;
- Tomonte: forma livre que possui um cisto de proteção, o qual pode se fixar em plantas aquáticas, bordas dos viveiros e em substratos inertes. Nessa fase realiza inúmeras divisões e formam entre 500 a 1000 células-filhas, denominadas tomitos, que por sua vez diferenciam-se em terontes infectantes que perfuram a parede do cisto e entram na água com natação livre, em busca de um novo hospedeiro para completar o ciclo novamente.

Figura 1 – Fases do ciclo de vida do parasita *Ichthyophthirius multifiliis*.



Fonte: Panorama da Aquicultura, 2012. Adaptado por Amorin, 2015.

A transmissão geralmente é horizontal, ou seja, o peixe parasitado passa a ser fonte de infestação para os outros peixes do ambiente de cultivo (PÁDUA et al., 2013). Os mesmos autores ressaltam que a água do cultivo atua como veículo para as formas infectantes, bem como os equipamentos utilizados na rotina da piscicultura como peneiras, puçás, redes de arrasto, entre outros.

A ictiofitiríase é uma doença agressiva aos peixes, pois além da infestação propriamente dita, serve de porta de entrada para outras doenças, causadas principalmente por bactérias (XU et al., 2012), pois a penetração do protozoário no hospedeiro causa lesão que pode se espalhar por todo o corpo do peixe. Com isso, os peixes muitas vezes reagem se esfregando do lado ou no fundo do viveiro, ocasionando lesões que favorecem o aparecimento de outras infecções (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

A ictiofitiríase é uma enfermidade de difícil tratamento, principalmente em viveiros de grande extensão, pois os parasitas estão localizados sob o epitélio do hospedeiro e os que estão dentro do cisto de proteção, secretado pelo tomonte, não são atingidos pelos fármacos administrados (PÁDUA et al., 2013).

Geralmente os tratamentos indicados na aquicultura convencional são formalina, verde malaquita entre outros (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008). Muitos dos insumos químicos usados como quimioterápicos na aquicultura, não são produtos desenvolvidos especificamente para o uso na mesma, sendo que geralmente são desenvolvidos para organismos terrestres, e os riscos para os organismos aquáticos (peixe vivo e peixe abatido) e para o meio ambiente, muitas vezes, ainda são desconhecidos (LOPES et al., 2006). O uso indiscriminado desses produtos em ambientes aquáticos é preocupante, pois não é possível saber o quanto se impacta o ambiente, os animais e se causam riscos à saúde humana (SCHALCH, 2007), por isso a importância de se buscar formas alternativas na prevenção e no controle de doenças, minimizando assim, os impactos ambientais e os possíveis riscos que as substâncias químicas podem causar no meio de cultivo e também para a saúde humana.

3.4 SISTEMA HEMATOLÓGICO, IMUNE E METABÓLICO DOS PEIXES

3.4.1 Sistema Hematológico e Imune

A hematologia estuda as células do sangue bem como as alterações dos padrões e os distúrbios morfológicos das células sanguíneas. Esse tecido tem como função distribuir calor, transportar os gases respiratórios, nutrientes, hormônios e produtos de excreção, além de atuar na defesa do organismo (TAVARES-DIAS et al., 2009). Assim, através do sangue é possível fazer diversas análises que demonstram as condições fisiológicas, possíveis alterações metabólicas decorrentes de diferentes condições de cultivo em animais, bem como no diagnóstico de enfermidades (ALDRIN et al., 1982; LAZZARI, et al., 2011; FIGUEREDO, 2013). Estabelecidos os valores sanguíneos de referência para uma determinada espécie, é possível monitorar alterações destes valores sob condições controladas (RANZINI-PAIVA; SILVA-

SOUZA, 2004), uma vez que os mesmos são susceptíveis à mudanças do ambiente aquático, auxiliando na compreensão do processo de adaptação dos animais ao ambiente (RANZINI-PAIVA et al., 2005).

Os componentes celulares do sangue dos peixes teleósteos são eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Os eritrócitos maduros são as células mais numerosas no sangue, e a sua principal função é transportar O₂ e CO₂ na circulação (TAVARES-DIAS et al., 2009). Os trombócitos são células completas com função equivalente às plaquetas em mamíferos, auxiliando na coagulação sanguínea e também possuem atividade fagocítica (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Os leucócitos são as células responsáveis pela defesa do organismo, sendo que este grupo é constituído por linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Estas células utilizam as vias sanguíneas para realizar o monitoramento de possíveis infecções ou injúrias teciduais (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

- Os linfócitos são os leucócitos mais numerosos na circulação sanguínea e são responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, promovendo a produção de anticorpos e aumento da capacidade citotóxica (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

- Os neutrófilos são as células mais importantes de defesa no sangue periférico devido à capacidade fagocítica e apresentam elevada sensibilidade a modificações ambientais (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

- Os monócitos são as maiores células do sangue periférico e quando migram para o foco lesional (tecidos) se diferenciam em macrófagos. Eles atuam na reação inflamatória e resposta imunológica nas quais ocorre fagocitose (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

- Os eosinófilos são células que intervêm nos processos de inflamação e na defesa celular relacionadas à infestação por parasitas (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

- Semelhante aos eosinófilos, os basófilos também se apresentam em pequena quantidade na circulação sanguínea. A função dos basófilos de peixes não está definida e parece estar ligada a processos alérgicos, já que possuem histamina em seus grânulos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Os peixes possuem um sistema imunológico bastante complexo, dividido em duas partes que se complementam: o sistema imune inato, que é próprio do animal para a ação de forma inespecífica e o sistema imune adquirido ou específico, que é formado durante as diferentes exposições à patógenos no decorrer de sua vida (IWANA, NAKANISHI, 1996). O sistema imune inato é considerado a primeira barreira de defesa frente aos patógenos e consiste basicamente de barreiras físicas (escamas, muco, brânquias e epiderme) e químicas como enzimas e proteínas do sistema complemento², além de células de defesa fagocíticas inespecíficas como macrófagos, neutrófilos e trombócitos (TORT et al. 2003; ABREU, 2007; TIZARD, 2008).

Já o sistema imune específico ou adquirido, é caracterizado pela especificidade e memória imunológica, envolvendo os órgãos e tecidos linfóides (primários e secundários), células apresentadoras de antígeno (APCs), linfócitos T e B, imunoglobulinas e moléculas do sistema complemento. Funciona bloqueando o desenvolvimento de nova infecção causada pelo mesmo patógeno (WEDEMEYER, 1996; VERLHAC; GABAUDAN, 1997; TORT et al., 2003).

Dentre os mecanismos de defesa, a fagocitose representa um importante mecanismo não específico contra agentes patogênicos que ultrapassam as barreiras superficiais de defesa sendo que os leucócitos são as células promotoras deste processo, tanto no sangue quanto nos tecidos. Durante a fagocitose, quando o patógeno é englobado, ocorre a formação de vesículas intracelulares chamadas de fagossomos. Estes fagossomos se unem aos lisossomos intracelulares formando os vacúolos digestivos. Os lisossomos são organelas citoplasmáticas que possuem diversas enzimas hidrolíticas e são responsáveis pela digestão intracelular. Nos vacúolos digestivos o pH é mais baixo o que permite a ativação das enzimas hidrolíticas que vão digerir o antígeno. Dentre as enzimas hidrolíticas encontramos a lisozima, produzida em maior quantidade durante as infecções (PAULSEN et al., 2003).

Em peixes, os leucócitos são os principais produtores de lisozima e o tecido renal parece apresentar os maiores índices de atividade enzimática, devido à alta concentração de leucócitos presente no tecido hematopoiético em

² O sistema complemento compreende um grupo de aproximadamente 35 proteínas envolvidas nas respostas imunes inespecíficas e específicas.

seu interior (BALFRY; IWAMA, 2004). Essa enzima é imprescindível na proteção do peixe contra patógenos, especialmente bactérias, devido às suas propriedades e também por estar localizada em áreas que estão frequentemente em contato com patógenos (Ex.: rins e muco da pele) (BALFRY; IWAMA, 2004). Esta enzima é capaz de lisar a parede celular de bactérias através da destruição dos peptídeoglicanos das bactérias gram-positivas, além disso, ela também destrói algumas bactérias gram-negativas em conjunto com as proteínas do sistema complemento (BALFRY; IWAMA, 2004; PAULSEN et al., 2003).

Além da atividade da lisozima, a defesa do hospedeiro em relação a inúmeros patógenos depende também dos efeitos citotóxicos do óxido nítrico (NO). O NO, molécula altamente instável e reativa, é sintetizada em praticamente todos os tecidos a partir de L-arginina e oxigênio pelas enzimas NO sintase (NOS). Os leucócitos, em especial monócitos e macrófagos, produzem NO após a indução da NOS como parte da resposta imune. O NO como radical livre reage com o ânion superóxido e forma peroxinitrito um potente oxidante que pode destruir os microrganismos invasores. Em presença de oxigênio e oxihemoglobina este radical é rapidamente degradado (meia-vida extremamente curta, de 4 a 6 segundos no plasma) produzindo nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) que são utilizados como marcadores para a determinação da produção de NO e da resposta imune (NATHAN; HIBBS, 1991; MOSHAGE, et al., 1995; ASL et al., 2008).

3.4.2 Sistema Metabólico

A condição metabólica e nutricional é um fator extremamente importante na resistência orgânica e resposta imune nos animais sendo que as principais fontes energéticas não proteicas utilizadas pelos peixes são carboidratos e lipídeos. Considerando o comportamento metabólico, o conjunto de enzimas relacionadas ao metabolismo de açúcares, gorduras e proteínas nos peixes é bastante distinto e as respostas à mudanças na dieta ou no ambiente podem ser extremamente variáveis dentre as inúmeras espécies de peixes (SEIXAS FILHO, 2004; LEHNINGER, 2011; SOUZA, 2012). Soma-se a isso diversos fatores como, por exemplo o tipo de dieta, idade, fisiologia, clima, genética e condição de cultivo dos animais que podem influenciar a atividade metabólica e

alterar o crescimento, o estado de saúde geral e a reprodução dos peixes (DE SILVA; ANDERSON, 1995; MOON, 2001; MELO, 2004; SOUZA, 2012).

De uma forma geral, o metabolismo tem a função de proporcionar a energia necessária para os processos vitais do organismo e compensar as perdas de substâncias resultantes dos desgastes ou exercícios, atendendo assim, ao desenvolvimento e crescimento do mesmo (SEIXAS FILHO, 2004). O autor afirma que, para manter o equilíbrio das funções vitais normais, a energia potencial ingerida com os alimentos é transformada em energia cinética, à qual, mediante o desdobramento e oxidação das biomoléculas (convertendo compostos químicos complexos em constituintes mais simples) fornece a energia necessária para a execução das atividades celulares.

O metabolismo da glicose é uma das principais fontes energéticas para as células dos peixes. Além disso, a glicose ingerida que não é prontamente metabolizada é convertida em glicogênio e armazenada no fígado e no músculo esquelético dos peixes, servindo como reserva de energia, sendo sua mobilização controlada pela ação de hormônios. Ainda, parte da glicose em excesso pode ser convertida em ácidos graxos e armazenada como triacilgliceróis (gordura), outra importante reserva energética dos animais (SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009).

A ação de hormônios como a insulina e o glucagon é essencial para a manutenção da homeostasia corporal (RAW, 2006; LEHNINGER et al., 2011). Na presença de insulina os tecidos são estimulados a utilizar a glicose como fonte de energia e armazená-la na forma de glicogênio. Na presença de glucagon e/ou dos hormônios contrarregulatórios como cortisol, adrenalina e hormônio do crescimento, o organismo é direcionado à ativação das vias de gliconeogênese e glicogenólise para manutenção das concentrações de glicose sanguínea (LEHNINGER et al., 2011).

O glicogênio hepático serve como reservatório de glicose para a corrente sanguínea com a distribuição para outros tecidos, sendo que as reservas apresentam um importante papel como fonte de glicose no período pré e pós-prandial (SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009). Os autores afirmam que o glicogênio muscular serve como fonte de glicose às células dos músculos para gerar ATP durante a atividade muscular, sendo que as reservas são formadas

durante o repouso, ou seja, em períodos onde há maior disponibilidade de glicose na corrente sanguínea como após as refeições.

Quando o peixe é exposto a uma situação de estresse, seja químico, físico ou biológico, ocorre a liberação do hormônio cortisol no sangue estimulando os tecidos a liberar maior quantidade de glicose para a corrente sanguínea em especial o fígado (gerando hiperglicemia), preparando assim, o animal para uma resposta de defesa (TAVARES-DIAS; MARTINS; MORAES, 2001; URBINATI; CARNEIRO, 2004; BARCELLOS et al., 2001). Como indicador do estado fisiológico e de estresse em peixes teleósteos as concentrações de glicose plasmática são consideradas bons marcadores metabólicos e têm sido bastante utilizadas (MARTINS, et al., 2002; MCELROY, et al., 2015).

Já em relação ao metabolismo de proteínas e aminoácidos, as enzimas alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico-pirúvica (GPT/TGP) e aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmico-oxalacética (GOT/TGO), são consideradas as enzimas mais importantes e desempenham papel essencial tanto na degradação quanto na síntese de aminoácidos. A atividade destas enzimas responde às variações nas concentrações sanguíneas dos hormônios metabólicos como insulina, glucagon, cortisol e adrenalina bem como à disponibilidade de nutrientes e necessidades das células. Estas enzimas apresentam ampla distribuição tecidual e além disso, são muito utilizadas como marcadores de lesão ou toxicidade celular. A ALT é uma enzima encontrada em maiores concentrações no citosol das células hepáticas, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos enquanto a AST está presente no citosol e mitocôndrias das células, sendo em concentrações mais altas no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas (ALVES, 2003; DÍAZ GONZÁLES; SILVA, 2006; LEHNINGER, 2011). Assim, para o acompanhamento da saúde dos peixes a avaliação da atividade dessas enzimas bem como da glicemia, vem sendo muito utilizada como marcador metabólico, de estresse e de toxicidade.

Para garantir o bom desempenho dos animais é extremamente importante que o funcionamento do organismo, ou seja, suas condições metabólicas e fisiológicas sejam mantidas dentro de determinados limites,

garantindo o equilíbrio nas atividades celulares e a homeostasia corporal. Para enfrentar situações adversas o organismo do animal apresenta uma série de alterações fisiológicas, conhecidas como respostas de estresse. Estresse é considerado um estado de ameaça a homeostase do organismo e seu restabelecimento é feito por um conjunto de respostas adaptativas. As respostas fisiológicas a agentes de estresse em peixes são semelhantes às encontradas em outras espécies de vertebrados. Estas respostas permitem ao animal adaptar-se e enfrentar o agente estressor a curto prazo. Por outro lado, a manutenção da condição estressante pode ocasionar danos ao organismo, uma vez que a energia disponível para as várias funções fisiológicas é destinada a órgãos e funções tidas como mais importantes na situação de estresse (BARCELLOS; SOUZA; WOEHL, 2000).

Dentre as consequências celulares observadas em situações de estresse, o desequilíbrio nos mecanismos oxidativos (geração de espécies reativas) e as defesas antioxidantes celulares, geram uma condição de estresse oxidativo, desempenhando um papel importante no comportamento fisiológico geral do animal (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares quando as espécies reativas são produzidas em excesso ou não são eficientemente removidas. Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. Os danos ocasionados pelas espécies reativas às membranas biológicas, processo conhecido como lipoperoxidação, podem ser monitorados através de diferentes métodos e podem ser utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo (LIVINGSTONE, 2001; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Além do acompanhamento dos danos provocados pelas espécies reativas, um outro mecanismo para se avaliar a homeostasia dos organismos

dos animais em termos de radicais livres é através da avaliação de diferentes componentes do sistema de defesa antioxidante, tanto enzimático quanto não enzimático (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; NORDBERG; ARNÉR, 2001). Dentre os diversos componentes do sistema de defesa antioxidante que atuam em conjunto para neutralizar os danos ocasionados pelas espécies reativas, a catalase é considerada uma enzima citoplasmática chave, amplamente distribuída nos tecidos dos peixes, com atividade particularmente alta nos eritrócitos e no fígado. A catalase é responsável pelo processo de destoxificação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) convertendo-o em água e oxigênio (LACKNER, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa da reação que produz o radical hidroxil (OH^\bullet) (reações de Fenton e de Haber-Weiss) extremamente danoso para as estruturas celulares. O H_2O_2 tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas e pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++} sendo considerado altamente tóxico para as células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Perturbações internas no organismo dos peixes, como resultado de alterações e estresse ambiental, geram respostas compensatórias envolvendo diversos sistemas e a liberação de várias substâncias para conter ou minimizar os efeitos tóxicos no metabolismo. Diante disso, os mecanismos de defesa antioxidantes dos peixes são importantes, pois são responsáveis pela remoção destes compostos tóxicos ao organismo sendo que quando essa remoção é inadequada ou insuficiente, aumenta o nível de estresse oxidativo dos tecidos, com dano às suas macromoléculas, o que pode até acarretar a morte do animal (VILÉLA, 2007).

3.5 EXTRATO VEGETAL DE ALHO (*Allium sativum*)

Na busca de alternativas frente ao modelo de produção convencional, os extratos vegetais estão cada vez mais sendo pesquisados, não apenas para o uso na aquicultura, mas também para outros animais e culturas vegetais, visando tratamentos ou prevenções de doenças. O uso de plantas medicinais na aquicultura é de fato promissor, sendo considerado um possível substituto aos tratamentos convencionais (VALLADÃO, 2014). O mesmo autor descreve

que o emprego de extratos vegetais na piscicultura pode contribuir com a redução da utilização de quimioterápicos em geral, proporcionando maior sustentabilidade à produção de peixes, com diminuição dos riscos ambientais, ao passo que pode prevenir bem como tratar doenças em lotes de peixes evitando mortalidades e, conseqüentemente, perdas econômicas.

Atualmente, é crescente o interesse sobre o potencial de substâncias oriundas de plantas como alternativas ao uso de antibióticos e produtos químicos no combate a patógenos em piscicultura (SANTOS; LUDKE; LIMA, 2009; VALADÃO, 2014). Porém, no Brasil existem poucos estudos científicos direcionados que detectem o potencial dessas plantas como tratamento ou profilaxia para doenças de peixes, as melhores formas de administração e quais tipos de patógenos são mais eficazmente combatidos e prevenidos com o seu uso (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2010). Neste contexto, o extrato de alho vem sendo estudado para uso na aquicultura, no entanto ainda faltam pesquisas, principalmente relacionadas à espécies nativas como o Jundiá.

O *Allium sativum*, do gênero *Allium*, pertencente à família botânica Liliaceae, popularmente conhecido como alho (Figura 2), é uma espécie vegetal que pode ser classificada como um alimento ou uma erva medicinal (VALENTE; ABOUA; PLESSIS, 2014). Segundo vários autores há controvérsias em relação ao seu local de origem, que pode ser do continente Asiático ou Europeu. Porém, atualmente é amplamente cultivado em todo o mundo (KEMPER, 2000) usado principalmente como condimento na alimentação humana, mas também possui uso medicinal, tanto para humanos como para animais.

Figura 2 – Planta inteira de Alho (*Allium sativum*).



Fonte: Amarin, 2016.

Neste contexto, nos últimos anos, várias pesquisas vêm sendo realizadas para possível utilização do alho para a nutrição animal e também para tratamento e prevenção de doenças. Esta planta vem sendo utilizada mais especificamente como estimulante do apetite, antilipêmico, anti-hipertensivo, antiateroesclerótico e antimicrobiano (SANTOS; VOGEL; MONTEIRO, 2011). O alho também apresenta atividades imunoestimulante, anticancerígena, hepatoprotetora, antioxidante, antiviral, antifúngica e também antiparasitária (KEMPER, 2000). Em sua composição química destacam-se os óleos essenciais, sais minerais, vitaminas, saponinas e flavonoides e, principalmente, os compostos sulfurados aliina e alicina. A alicina (di-propeniltiosulfinato) é proveniente da transformação da aliina pela enzima alinase, logo após o alho ser amassado ou cortado e apresenta atividade antifúngica e antibiótica (MARCHIORI, 2009; VALENTE; ABOUA; PLESSIS, 2014).

Na aquicultura, já foram demonstrados efeitos do alho como promotor de crescimento em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e em esturjão (*Acipenser ruthenus*) (DIAB; EL-NAGAR; ABD-EL-HADY, 2002; SHALABY; KHATTAB; ABDEL RAHMAN, 2006; LEE; GAO, 2012). Também o uso de extratos de alho para banhos ou adicionado à ração com diferentes concentrações e tempos de tratamento estudados em diferentes espécies de peixes apresentou eficácia contra parasitas como *Trichodina* spp. (CHITMANAT et al., 2005), *Gyrodactylus turnbulli* (SCHELKLE et al., 2013), *Neobenedenia* sp. (MILITZ et al., 2013), *Trichodina* sp. e *Gyrodactylus* sp. (ABDEL-GALIL; EABOELHADID, 2012) e bactérias como *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* (DIAB et al., 2008; MUNIRUZZAMAN; CHOWDHURY, 2008), *Anacanthorus penilabiatus* (MARTINS et al., 2002), *Pseudomonas* spp. (JOHN et al., 2007). Ainda, estudos de Buchmann et al. (2003) demonstraram a eficácia do extrato de alho nas concentrações de 117 mg/L e 570 mg/L após 24 horas de teste *in vitro* contra tomontes de *I. multifiliis*.

Frente à necessidade do desenvolvimento da piscicultura como atividade econômica e ambientalmente sustentável, certamente a adoção de medidas sanitárias naturais representa uma alternativa importante para o combate e prevenção de doenças. Neste sentido, o uso de técnicas alternativas que possam ser facilmente implementadas e executadas pelos produtores merecem atenção. Quanto ao uso do alho, este poderia ser aplicado tanto na forma de banhos ou como suplemento na alimentação dos animais. Na alimentação, uma das maneiras mais simples de incluir o alho como tratamento ou profilático para o produtor seria através do preparo do extrato bruto (alho macerado em água ou mistura de etanol/água por exemplo) e aspersão do extrato de alho na ração, já que a inclusão do alho durante a fabricação da ração tornaria o processo mais oneroso e provavelmente impossibilitaria o processo de ser feito na propriedade.

Nesse sentido, o uso de plantas medicinais e extratos vegetais na piscicultura pode ser um campo muito promissor, principalmente relacionado a pesquisas aplicadas em criações de peixes que de uma maneira geral, ainda são escassas no Brasil. Além disso, somente através de pesquisas de caráter experimental será possível obter evidências adequadas e confiáveis para a aceitação do uso do extrato de alho em escala de produção animal comercial.

4 METODOLOGIA

O experimento foi realizado nos laboratórios de Patologia e de Bioquímica e Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus de Laranjeiras do Sul, com duração de 86 dias.

4.1 MATERIAIS

Os reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da Sigma Chemical CO (St. Louis, MO, USA) e Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os reagentes são de grau analítico (P.A). Os kits para dosagens sanguíneas foram adquiridos da Gold Analisa (Belo Horizonte, MG, Brasil).

4.2 SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO

O sistema de recirculação foi mantido em ambiente climatizado (30 °C), sendo constantemente aerado com bomba de oxigênio e distribuído em sistema fechado com uma única linha de tratamento de água (Figura 3). Este sistema foi composto por 8 aquários (caixa pretas de polietileno de dimensões 36,5 x 51 x 16,5 cm (LxCxA)), com fluxo contínuo de água, sendo que cada aquário possuía uma entrada e uma saída individual que descarregava a água em um filtro mecânico e posteriormente em um biofiltro. Como filtro mecânico foi utilizado uma bacia plástica perfurada, e dentro colocado um filtro para depurador (Scotch Brite (bidin)). O mesmo foi responsável pela retirada de partículas sólidas em suspensão, sendo que partículas entre 100 e 40 micra compõem cerca de 25% dos sólidos totais dos tanques suspensos na coluna d'água (KUBITZA, 2006). O biofiltro foi composto por um reservatório de 100 L e como substrato para a fixação das bactérias nitrificantes (gêneros *Nitrosomonas* - que realizam a oxidação da amônia a nitrito - e *Nitrobacter* - que oxida o nitrito a nitrato) foi utilizado mangueira corrugada picada. No biofiltro foram utilizadas duas bombas de oxigênio para a manutenção das bactérias e o controle da temperatura foi realizado por meio de termostatos. Para o recalque e distribuição da água nos aquários foi utilizada uma bomba com vazão de 1200 L/h, e altura máxima de 1,30 m modelo H1200 (Vigo Ar).

O sistema de recirculação de água (aquários e biofiltro), recebeu água salobra (salinidade 2‰), com sal não iodado (apenas para o sistema de estudo

basal). A temperatura da água foi monitorada duas vezes ao dia, por meio de um termômetro de mercúrio. O oxigênio dissolvido na água, pH e a salinidade foram avaliados diariamente (duas vezes ao dia) com a sonda multiparâmetros YSI 63. Os valores de amônia (NH_3) e íons nitrito/nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) foram mensurados através de kit comercial específico (Alfa kit), sendo NH_3 diariamente e NO_2^- a cada 15 dias.

Figura 3 – Sistema de recirculação de água.



Fonte: Amorin, 2016.

4.3 ANIMAIS

Para a realização do experimento o projeto foi submetido ao CEUA/UFFS (Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal da Fronteira Sul) e certificado pelo protocolo n^o 232055.004131/2015-50, estando apto para o desenvolvimento da pesquisa.

Os alevinos de *R. quelen* (n = 80) foram adquiridos de reprodução realizada nas dependências da UFFS, com peso médio de $9,55 \pm 2,1$ g e comprimento padrão médio de $8,5 \pm 0,7$ cm. Na chegada ao laboratório, os animais foram submetidos à banho de imersão em NaCl 3% por 10 minutos como profilaxia à agentes patogênicos, conforme recomendação de Pavanelli et al. (2008).

Os animais foram transferidos para aquários escuros com 46 L de água, sendo distribuídos 10 peixes por aquário, onde foram mantidos para aclimatação por um período de 7 dias (Figura 4), com base no trabalho de Tancredo (2015).

4.4 *Allium sativum* E DIETAS EXPERIMENTAIS

Para as dietas experimentais foi utilizado extrato seco de alho padronizado contendo 0,5% de alicina, adquirido de fonte comercial (Active Pharmaceutica, São José, SC, Brasil). A alimentação dos animais foi baseada no método da aparente saciedade. Os animais foram alimentados 2 vezes ao dia (7 h e às 17 h) com ração comercial (32% de proteína, extrusada), por 86 dias, acrescida ou não de extrato de alho.

O extrato de alho foi pesado e diluído em etanol 100% de acordo com as concentrações de cada tratamento. Após foi realizada a aspensão de forma homogênea na ração. A mesma foi seca ao ar, embalada e conservada em temperatura de aproximadamente 4 °C (refrigerador). A ração do grupo controle recebeu por aspensão o mesmo volume de etanol 100% que as demais rações e passou pelos mesmos processos de secagem e conservação que as rações suplementadas com extrato de alho.

Os experimentos de suplementação e desafio foram realizados contendo um controle e três concentrações de tratamento. Os animais foram divididos em 04 grupos (n = 20 por grupo), mantidos em aquários e submetidos à

suplementação dietética com diferentes concentrações de extrato de alho (ração comercial padrão acrescida de extrato de alho por aspersão) por 86 dias: grupo I (controle) peixes que receberam ração sem suplementação com extrato de alho; grupo II (extrato 0,5% - T1) peixes que receberam ração suplementada com 0,5% de extrato de alho; grupo III (extrato 2,5% - T2) peixes que receberam ração suplementada com 2,5% de extrato de alho; Grupo IV (extrato 5% - T3) peixes que receberam ração suplementada com 5% de extrato de alho.

As concentrações dos extratos de alho e o tempo de tratamento escolhidos foram baseados em estudos anteriores de suplementação de peixes com alho (SHALABY; KHATTAB; ABDEL RAHMAN, 2006; BARD et al., 2006).

4.5 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS

Durante o desenvolvimento do experimento foram registradas as mortes ocorridas para cálculo de sobrevivência. No início e no final do experimento (86 dias) foi realizada uma biometria total mensurando peso, comprimento total e comprimento padrão dos peixes não desafiados. Estas variáveis foram determinadas utilizando uma balança digital e um ictiômetro. A análise do consumo de ração para cada tratamento e o grupo controle foi realizada diariamente através da pesagem da ração oferecida, recolhimento da ração não consumida, secagem, pesagem e posterior subtração do peso inicial. Com os dados foram calculados o ganho de peso, $GP=(\text{Peso final} - \text{Peso inicial})$; ganho de comprimento padrão, $GCP=(\text{Comprimento Padrão Final} - \text{Comprimento Padrão Inicial})$; ganho de comprimento total $GCT=(\text{Comprimento Total Final} - \text{Comprimento Total Inicial})$; e conversão alimentar, $CA= (\text{alimento consumido/ganho em peso})$.

4.6 DESAFIO COM *Ichthyophthirius multifiliis*

Após 77 dias de alimentação suplementada com extrato de alho, metade dos animais ($n = 10$) de cada grupo de tratamento e controle foram submetidos ao desafio com o parasita *Ichthyophthirius multifiliis*, mantendo a ração suplementada. A outra metade dos animais ($n = 10$) dos grupos de tratamento

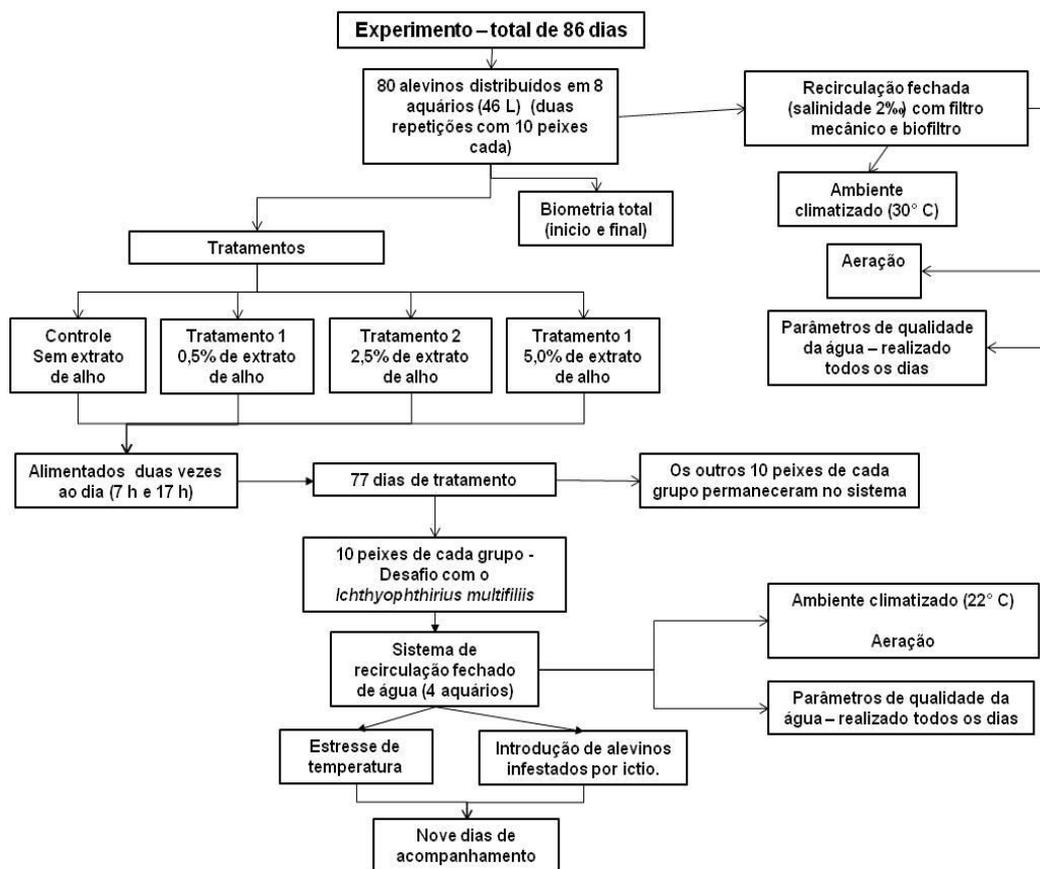
e controle foram mantidos no sistema de circulação original recebendo a suplementação dietética.

Para o desafio, os animais foram transferidos para um novo sistema de circulação fechada em ambiente climatizado (22 °C) com aeração constante. Este sistema contou com fluxo contínuo de água, sendo que cada aquário (total de quatro aquários) teve uma entrada e uma saída individual que descarregou a água em um filtro mecânico e posteriormente em um biofiltro. Foi realizada a avaliação de parâmetros de qualidade da água da mesma forma que durante o período de suplementação. Nesse período os animais continuaram recebendo ração com os devidos tratamentos.

A exposição ao parasita foi realizada através da introdução nos aquários, de alevinos de jundiá naturalmente infestados pelo parasita *I. multifiliis* (SOUZA et al., 2001). Além disso, os animais foram submetidos à estresse por temperatura, partindo de aquários à 27 °C sendo transferidos para aquários à 10 °C por aproximadamente 7 minutos e após mantidos em aquários a 17 °C por 24 h e depois em aquários com temperatura de 23 °C por três dias. No quarto dia os animais foram submetidos a um novo estresse por temperatura, passando de 23 °C para 10 °C por aproximadamente 7 minutos e retornando para a temperatura de 23 °C. Durante todo o período, foram mantidos nos aquários animais naturalmente infestados com o parasita *I. multifiliis*. No quinto dia do desafio começaram a aparecer os primeiros pontos brancos indicando a infestação pelos parasitas, resultado semelhante foi encontrado por Vargas et al. (2008) com alevinos de *R. quelen*. Após o aparecimento dos primeiros pontos brancos, os animais foram acompanhados por um período adicional de quatro dias. O número de indivíduos mortos em cada aquário foi registrado diariamente para cálculo da taxa de sobrevivência.

Após o período de infestação experimental, para os animais que sobreviveram ao desafio foram coletadas amostras de sangue para as análises hematológicas e tecidos (brânquias e músculo com pele) para análises histológicas. O grau de infestação foi avaliado através de contagem parasitológica com auxílio de lupa (SOUZA et al., 2001; VARGAS et al., 2008; BORBA et al., 2007). Para essa contagem foi realizado uma raspagem da lateral do peixe, com uma área correspondente a 10 cm² e retirado o segundo arco branquial do mesmo lado do peixe.

Figura 4: Fluxograma dos tratamentos e do desafio com o parasita.



4.7 COLETA DE SANGUE E PREPARO DE PLASMA

Após o período experimental de alimentação com cada dieta e também após o desafio, os animais foram anestesiados com óleo de cravo (50 mg/L) primeiramente diluído em etanol na concentração de 50 mg/mL e adicionado em 10 L de água. Após, foi realizada coleta de sangue por punção do vaso caudal utilizando uma seringa contendo solução de anticoagulante heparina (Figura 5).

O sangue coletado foi separado em alíquotas para as seguintes análises: contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer e confecção de extensões sanguíneas em triplicata posteriormente coradas com May-Grunwald/Giemsa pelo método de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947) e utilizadas para contagem total e diferencial de leucócitos e contagem total do número de trombócitos (DOTTA, 2013). Para a contagem dos leucócitos totais e trombócitos foi realizada a contagem em esfregaço de 2000 células (hemácias, leucócitos e trombócitos) e após identificadas as porcentagens de leucócitos e

trombócitos em relação ao número total das células contadas. Ainda, uma alíquota foi armazenada em capilares de microhematócrito para determinação do percentual de hematócrito (GOLDENFARB et al., 1971). Foi realizada a determinação do conteúdo de hemoglobina através de kit colorimétrico (Bioclin). Além disso, parte do sangue coletado foi armazenado em microtubos e centrifugado a 3000 xg durante 10 minutos. O plasma recolhido foi armazenado a -20 °C até a utilização para os ensaios bioquímicos e imunes (DOTTA, 2013).

4.8 COLETA DE TECIDOS

Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados por aprofundamento do estado anestésico com óleo de cravo conforme as recomendações do Comitê de Ética no Uso dos Animais/ UFFS e CONCEA para posterior remoção de amostras de brânquias e músculo com pele para avaliações histológicas e fígado, músculo, rim e baço para análises bioquímicas.

4.9 NÍVEIS DE LISOZIMA PLASMÁTICA

Os níveis de lisozima sérica dos peixes não desafiados foram medidos por espectrofotometria de acordo com a metodologia de Ellis (1990) com modificações (VILLAMIL et al., 2002; AZZA et al., 2009). Uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) (0,5 mg/mL) em tampão fosfato 0,04 M, pH 6,2 foi utilizada como substrato. Para a curva de calibração utilizou-se lisozima liofilizada (100 µg/mL) de clara de ovo de galinha em tampão fosfato 0,04 M, pH 6,2. Para cada ensaio foi preparada uma nova curva padrão. As concentrações de lisozima utilizadas para a construção da curva padrão foram 100, 50, 40, 30, 20, 15, 12,5, 10, 7,5, 5, 2,5 e 0 µg de lisozima/mL. Para a realização do ensaio, 30 µL das amostras de plasma de juvenis de Jundiá e dos padrões da curva foram pipetadas em triplicata em microplaca de 96 poços, incubadas a 35 °C por dois minutos e acrescidas de 200 µL da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,5 mg/mL) em tampão fosfato 0,04 M, pH 6,2. Após agitação, a redução na densidade óptica (ΔDO) foi acompanhada em espectrofotômetro a 492 nm com medidas a cada 30

segundos por 30 minutos. Os resultados foram expressos em μg de lisozima/mL.

4.10 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO

O Óxido Nitrico (NO) foi quantificado por meio da formação de seus metabólitos: nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). As amostras de plasma dos animais não desafiados desproteinizado (através de incubação com sulfato de zinco) (100 μL) foram incubadas com 200 μL da solução de Griess (sulfanilamida (1%) (p/v) em HCl 5% (v/v), N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v) e cloreto de vanádio III 0.05 M (1:1)) em microplaca durante 40 minutos, a 37 °C (MIRANDA et al., 2001; VILLAMIL et al., 2002). A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades ópticas em leitora de microplacas em 540 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão realizada com uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) (0-200 μM) e expressos em μM de nitrato/nitrito.

4.11 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO

Para determinação do conteúdo de glicogênio muscular e hepático, músculo e fígado foram removidos dos juvenis de Jundiá não desafiados após o período de suplementação na dieta. Os tecidos foram pesados e digeridos com KOH 33% sob fervura a 100 °C por 20 min. Após a fervura, foi adicionado etanol 96% e novamente, as amostras foram submetidas à fervura seguida de banho de gelo para precipitação do glicogênio. As amostras foram então centrifugadas a 1300 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, solubilizado em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado pelo tratamento com reagente de iodo e posterior leitura em espectrofotômetro a 460 nm. Os resultados foram expressos em mg de glicogênio/g de tecido (KRISMAN, 1962).

4.12 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS

O plasma dos juvenis de Jundiá (não desafiados) foi utilizado para as dosagens bioquímicas de glicose, aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-

aminotransferase (ALT) utilizando kits comerciais (Gold Analisa[®]) e seguindo as instruções dos fabricantes. As amostras de fígado, rim, músculo e baço foram utilizadas para determinação da atividade da aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT) utilizando os mesmos kits comerciais (Gold Analisa).

4.13 ATIVIDADE DA CATALASE

Para a determinação da atividade da catalase, amostras de fígado, rim e baço (dos peixes não desafiados) foram homogeneizadas com uma solução contendo PBS, pH 7,2 e centrifugadas a 5000 g por 10 min. Uma alíquota do sobrenadante foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). As determinações enzimáticas foram realizadas usando-se o sobrenadante da centrifugação dos homogenatos, normalizados para 1 mg proteína/mL. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A atividade da catalase foi determinada segundo o método descrito por Aebi (1984), que é baseado na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio. O meio de reação consistiu de 10 µg de proteína e peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão Tris (50 mM), EDTA (0,25 mM), pH 8,0 em volume final de 2 mL. A leitura foi realizada espectrofotometricamente a 240 nm e os resultados foram expressos em mmol de peróxido de hidrogênio degradado.mg⁻¹ de proteína.min⁻¹.

4.14 LIPOPEROXIDAÇÃO - LPO

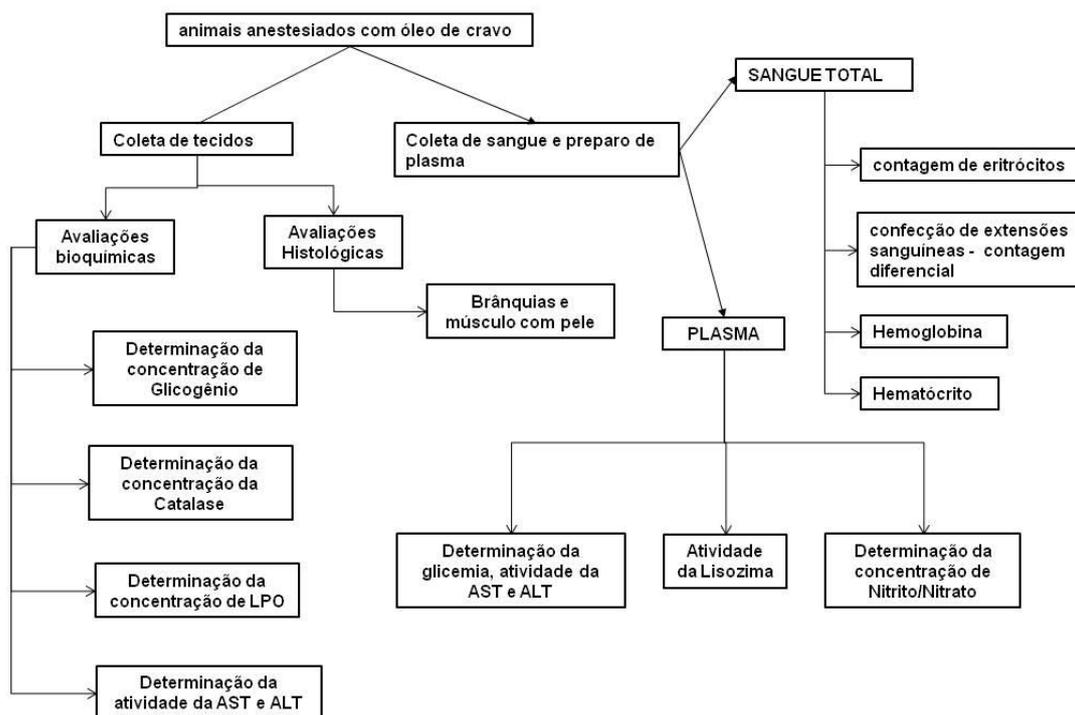
Os níveis de lipoperoxidação foram medidos no sobrenadante dos homogenatos (normalizados para 1 mg proteína/mL) dos tecidos (rim, fígado, baço e músculo) dos peixes não desafiados. Foi realizado o método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (Buege; Aust, 1978), realizando comparações de absorvância com curva padrão de Malondialdeído (MDA), principal subproduto de peroxidação lipídica celular. Para preparação da amostra o meio contendo alíquota de 0,33 mg/mL de proteína da amostra em ácido tricloroacético (TCA) 6,7% em volume final de 180 µL, foi agitado em vórtex, deixado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 12000 xg a 4 °C. Para a dosagem das substâncias reativas ao ácido

tiobarbitúrico (TBARS), 40 uL do sobrenadante, assim como de diferentes concentrações de MDA foram adicionados em microplaca, em triplicata, em meio de reação contendo 21,42 mM de ácido tiobarbitúrico (TBA), 17,86 mM de NaOH (utilizado para solubilização do TBA), 0,73 M de TCA, 0,032mM de BHT, etanol 3% (utilizado para solubilização do BHT) em PBS. A leitura da reação foi realizada à 22 °C, após 60 minutos de incubação a 60 °C, em uma absorbância de 535 nm. Os valores forma expressos em nmol de MDA.mg de proteína⁻¹, a partir de curva padrão preparada com malondialdeído (MDA) nas mesmas condições de análises (FEDERICI; SHAM; HANDY, 2007).

4.15 HISTOLOGIA

Para a análise histológica, fragmentos de tecidos de músculo com tegumento e brânquias de jundiás não desafiados e desafiados com o parasita foram fixados em formalina 10% tamponada por 24 h, transferidos para álcool 70° e posteriormente submetidos aos procedimentos histológicos de rotina. O processamento histológico de rotina foi realizado com a desidratação dos órgãos através de série alcoólica crescente, diafanização em xilol e finalização com a impregnação e a inclusão em parafina (BEÇAK; PAULETE, 1976). Os blocos foram cortados em micrótomo do modelo Minnot, e foram corados pela ação combinada de Hematoxilina de Harris e Eosina para descrição da morfologia (HOROBIN; BANCROFT, 1998). As lâminas foram analisadas e a documentação fotográfica realizada em microscópio fotográfico.

Figura 5 – Fluxograma das avaliações hematológicas, imunes, bioquímicas e histológicas.



4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm Desvio Padrão. Todas as análises foram realizadas no programa R (Versão 0.99.896). O delineamento utilizado neste estudo foi o inteiramente casualizado. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk à 5% de probabilidade. A homocedasticidade foi verificada através do Teste de Bartlett. Quando atenderam aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, as comparações estatísticas foram submetidas à análise de variância e a comparação das médias foi feita através do Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações bioquímica, imune e hematológica bem como a análise estatística foram realizadas apenas com os peixes que não foram desafiados com o parasita *Ichthyophthirius multifiliis* devido à baixa sobrevivência obtida após o desafio. Para os animais que sobreviveram ao desafio, foi realizada apenas avaliação histológica qualitativa dos tecidos e identificação de leucócitos em esfregaço sanguíneo, conforme apresentado nos itens subsequentes.

5.1 PARTE 1 – PEIXES NÃO DESAFIADOS COM O PARASITA *Ichthyophthirius multifiliis*

5.1.1 Sistema de Recirculação Fechado e Parâmetros de Qualidade de Água

O sistema de recirculação de água foi acompanhado diariamente, verificando-se duas vezes ao dia os parâmetros de qualidade da água. Os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se dentro da faixa tolerada e próximos aos valores ideais para a espécie *R. quelen* na fase de juvenil segundo valores propostos por Baldisserotto (2013), como mostra a tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros da qualidade da água durante o período experimental para o sistema de circulação.

Sistemas	Temperatura (°C)	O ₂ (mg/L)	NH ₃ (mg/L)	Salinidade (‰)	pH
Sistema	27,22 ± 0,60	4,80 ± 0,58	0,37 ± 0,35	2,02 ± 0,17	7,08 ± 0,19

O₂ – Oxigênio dissolvido; NH₃ – Amônia.

5.1.2 Parâmetros de Sobrevivência e Crescimento

Ao final dos 86 dias de experimento, a taxa de sobrevivência dos peixes que não foram desafiados com o parasita *I. multifiliis* foi de 95%, sendo que foi observada a morte de dois animais, sendo do tratamento 1 e do tratamento 2, com 0,5 e 2,5 % de extrato de alho, respectivamente.

As variáveis de crescimento avaliadas foram a taxa de crescimento dos animais durante o período experimental. Como pode ser observado na tabela 2 não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para os valores de peso final,

comprimento total final e comprimento padrão final entre os grupos controle, T1, T2 e T3. Também foi realizado o cálculo do ganho de peso médio em gramas para cada grupo, representando 52,45 (g), 39,29 (g), 29,37 (g) e 39,24 (g) para o controle, T1, T2 e T3 respectivamente. Para o Ganho de Comprimento Padrão em centímetros (cm) temos para o controle 6,55 cm, T1 5,43 cm, T2 4,59 cm e para o T3 5,45 cm. Já para o Ganho de Comprimento Total temos 7,69; 6,21; 5,22 e 6,37 para o controle, T1, T2 e T3 respectivamente.

Em relação ao consumo de ração por tratamento e grupo controle (Tabela 3) o tratamento 2 que recebeu 2,5% de extrato de alho foi o grupo que apresentou o menor consumo de ração. Este resultado é corroborado pela taxa de conversão alimentar de 13,10; 11,81; 9,05 e 13,11 para o controle, T1, T2 e T3 respectivamente.

Esses dados demonstram que a suplementação com extrato de alho não influenciou significativamente o ganho de peso e o crescimento dos animais no período estudado.

Tabela 2 - Parâmetros de biometria total inicial e final de *R. quelen* submetidos a dieta com diferentes concentrações de extrato de alho.

Parâmetros	Tratamentos			
	Controle	T1	T2	T3
PI (g)	9,17 ± 2,18	9,71 ± 1,92	9,15 ± 1,60	10,13 ± 2,64
PF (g)	61,62 ± 24,75	49,04 ± 21,02	38,52 ± 13,88	49,37 ± 13,51
CPI (cm)	8,43 ± 0,69	8,57 ± 0,54	8,35 ± 0,73	8,55 ± 0,88
CPF (cm)	14,98 ± 2,12	14,00 ± 2,18	12,94 ± 1,74	14,00 ± 1,31
CTI (cm)	10,09 ± 0,83	10,34 ± 0,76	10,09 ± 0,81	10,43 ± 0,99
CTF (cm)	17,78 ± 2,25	16,56 ± 2,53	15,31 ± 1,90	16,80 ± 1,53

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho). Peso Inicial (PI); Peso Final (PF); Comprimento Padrão Inicial (CPI); Comprimento Padrão Final (CPF); Comprimento Total Inicial (CTI); Comprimento Total Final (CTF).

Tabela 3 – Consumo médio de ração por *R. quelen* durante o período experimental.

	Controle	T1	T2	T3
Consumo de ração (g)	687,18	464,15	265,95	514,54

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho); T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho).

Resultados semelhantes foram encontrados em *R. quelen* submetidos a dieta alimentar com diferentes níveis de inclusão de *A. sativum* (3, 6, 9 e 12 g/kg de ração), sendo que o peso final médio e o comprimento final médio não

apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os tratamentos (BARD, et al., 2006). Ndong e Fall (2007) obtiveram resultados similares com juvenis híbridos de tilápia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) com peso inicial de $25,5 \pm 1,0$ g, com dietas de alho cru com 0,5 e 1 g/kg de ração, no qual não foi observado efeito significativo sobre o ganho de peso dos animais durante quatro semanas. Ainda, Diab et al. (2008) com 90 dias de tratamento com a espécie *O. niloticus*, alimentando com 1% e 2% de alho na ração não demonstrou alterações significativas no ganho de peso corporal e taxa de crescimento.

Por outro lado, trabalhos desenvolvidos com diferentes espécies demonstraram resultados positivos em relação ao ganho de peso, como Shalaby, Khattab e Abdel Rahman (2006) que encontraram resultados positivos em *O. niloticus* alimentados com alho, sendo que com 30 g/kg de ração os animais apresentaram maior peso final comparados com o controle e aos demais tratamentos. Aumento de ganho de peso e da taxa de crescimento em *O. niloticus* também foram observados com a suplementação de 3% de extrato de alho durante os meses de verão (ALY; MOHAMED, 2010). Diab et al. (2008) trabalhando com *O. niloticus*, num período mais longo, de seis meses de tratamento, obtiveram o melhor desempenho de crescimento em *O. niloticus* com 1% de alho/kg de dieta. Charjan e Kulkarni (2013) também obtiveram efeitos significativos referentes ao ganho de peso e desempenho do crescimento de *Channa Orientalis*, alimentados com diferentes níveis de alho na ração, durante dois meses. Além disso, Talpur e Ikhwanuddin (2012) obtiveram um aumento significativo no ganho de peso em *Lates calcarifer* alimentados com alho (20 g de alho/kg de ração) em relação ao grupo controle.

A partir dos dados da literatura e dos resultados obtidos neste trabalho pode-se observar que o uso do alho como aditivo na alimentação para estimular ganho de peso e crescimento não se aplica da mesma maneira para todas as espécies de peixes apresentando resultados bastante variados e contraditórios, reforçando a hipótese de que dose, tempo e estágio de desenvolvimento dos animais são fatores determinantes para a observação de efeitos positivos nestes parâmetros produtivos.

5.1.3 Parâmetros Bioquímicos

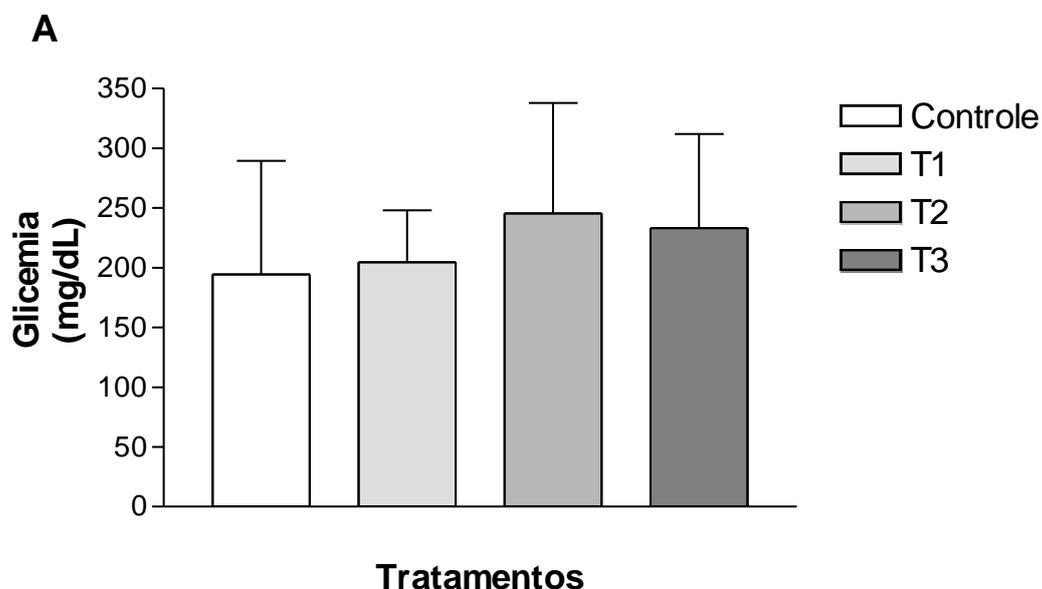
A condição metabólica e nutricional é um fator extremamente importante na resistência orgânica e resposta imune nos animais. Considerando que o metabolismo de carboidratos é uma das principais fontes de energia dos peixes e que a manipulação da dieta e condições de estresse podem provocar variações nas repostas metabólicas e conseqüentemente nas concentrações de glicose no sangue dos animais, estudou-se a influência do extrato de alho na glicemia e na concentração de glicogênio em músculo e fígado dos jundiás. Como pode ser observado na figura 6A, não houve variação significativa ($p>0,05$) da glicemia para os tratamentos com dietas contendo extrato de alho comparados com o grupo controle durante o período experimental. Além disso, também não foi verificada alteração significativa do conteúdo de glicogênio hepático em nenhum dos tratamentos comparados com o controle (Figura 6B). Em termos de controle dos níveis de glicose sanguínea, o fígado exerce papel primordial, pois é através da captação de glicose e síntese de glicogênio durante o período alimentado e da ativação da gliconeogênese e glicogenólise durante os períodos de jejum ou de estresse que as concentrações de glicose são mantidas dentro dos limites da normalidade nos animais (MOON; FOSTER, 1995; SEIXAS-FILHO, 2004; MALHEIROS, 2006).

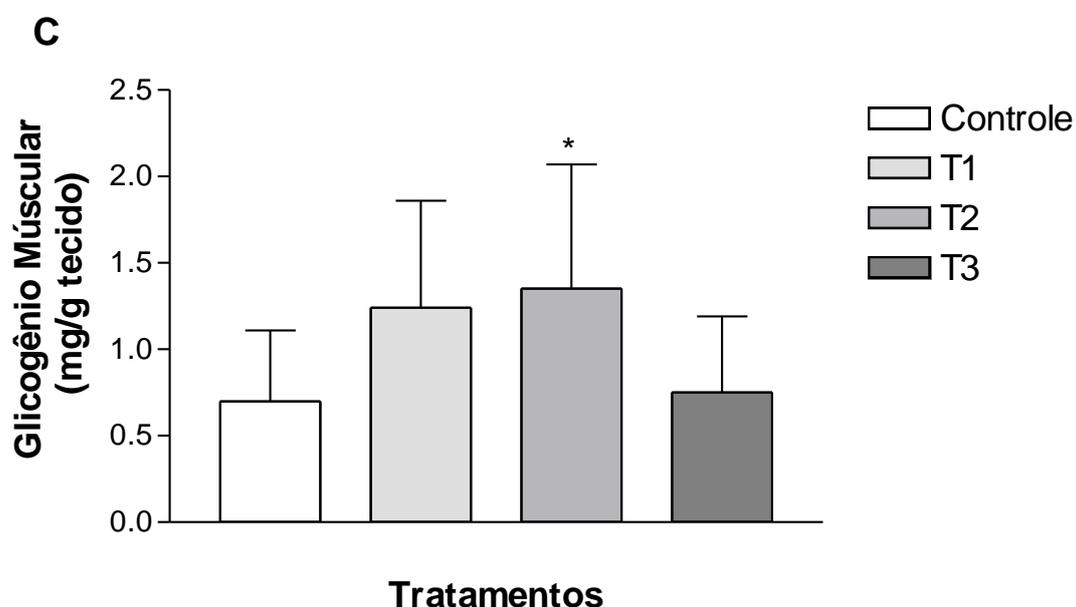
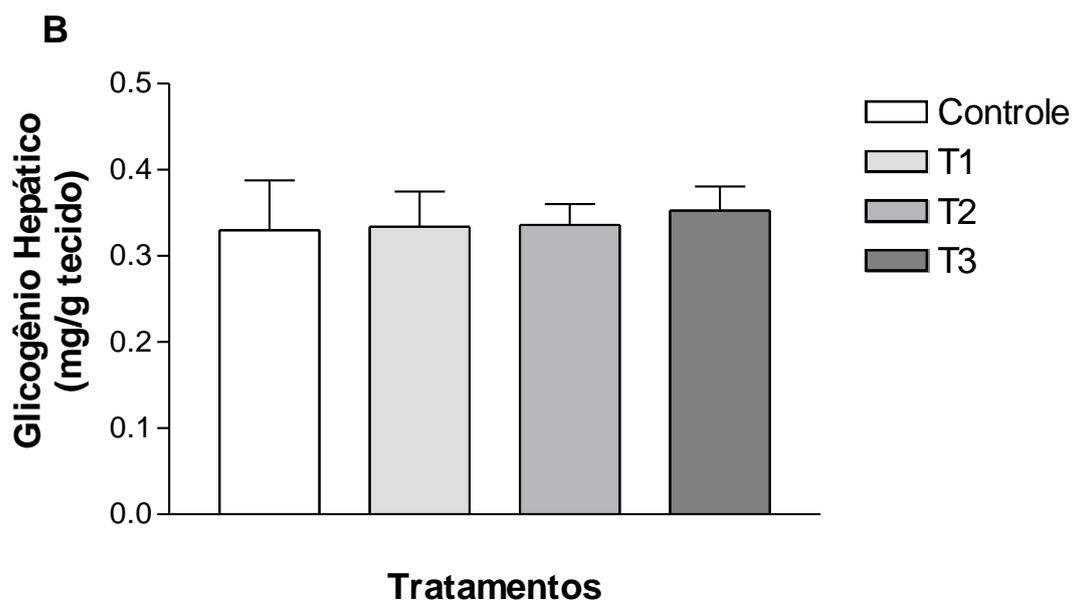
Estudos demonstram que a suplementação com alho está associada a reduções significativas da glicemia em diferentes espécies e que este efeito é observado com concentrações mais elevadas de alho na ração (TALPUR; IKHWANUDDIN, 2012; SHALABY; KHATTAB; ABDEL RAHMAN, 2006). A ausência de alterações da glicemia no presente estudo pode ser considerada um fator positivo, já que geralmente as alterações imunes em animais estressados ou doentes estão relacionadas com hiperglicemia. O aumento da glicose no plasma está relacionado a obtenção de energia para suportar e superar a condição de estresse existente. Nesta condição, a hiperglicemia é uma resposta ao aumento da liberação de cortisol, que prepara o organismo para uma resposta de defesa contra situações de estresse ou de combate a patógenos (TAVARES-DIAS et al., 2001; URBINATI, CARNEIRO, 2004; BARCELLOS et al., 2001).

Os resultados deste estudo indicam que o extrato de alho não alterou as concentrações de glicose sanguínea, fato corroborado pela ausência de efeito no metabolismo do glicogênio hepático, o que sugere que a adição de alho na ração não promova alterações dinâmicas na homeostasia da glicose.

Por outro lado, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) no conteúdo de glicogênio muscular no tratamento 2 (2,5% de extrato de alho) comparado com o controle e os demais tratamentos (Figura 6C) indicando que o alho pode atuar promovendo o estímulo da síntese de glicogênio no músculo e aumentando a reserva deste polissacarídeo que serve como fonte de energia para as células musculares (SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009).

Figura 6 – (A) Glicemia de *R. quelen*.; (B) Conteúdo de glicogênio hepático e (C) Conteúdo de glicogênio muscular de *R. quelen* após período de tratamento com diferentes concentrações de extrato de alho.



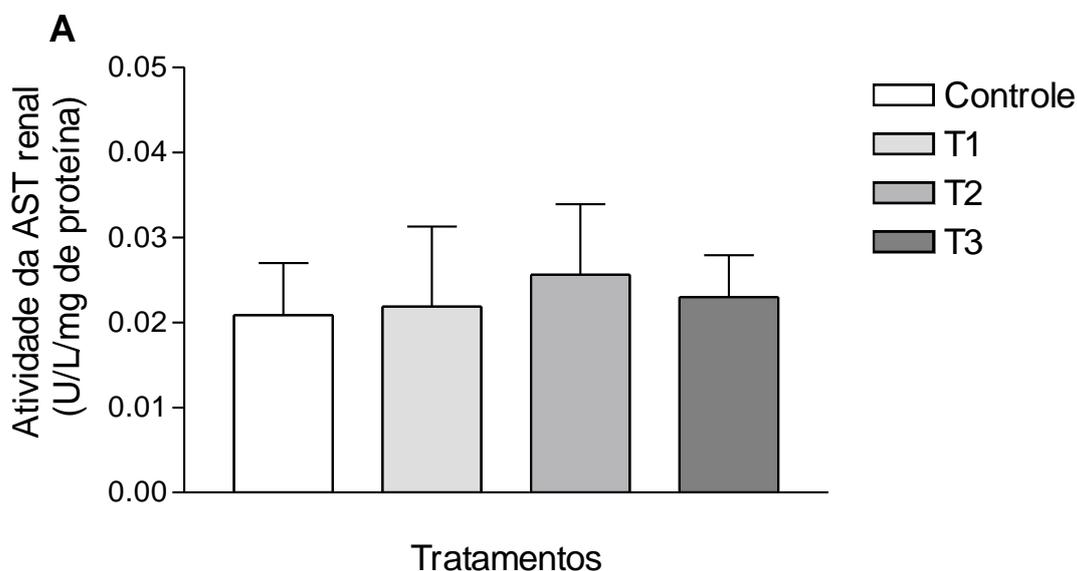


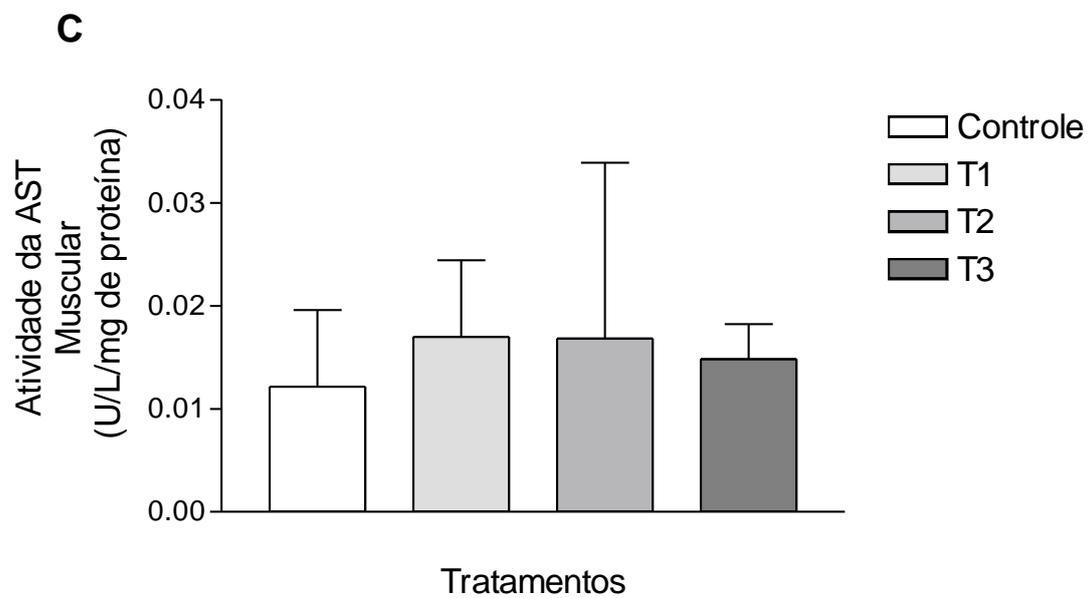
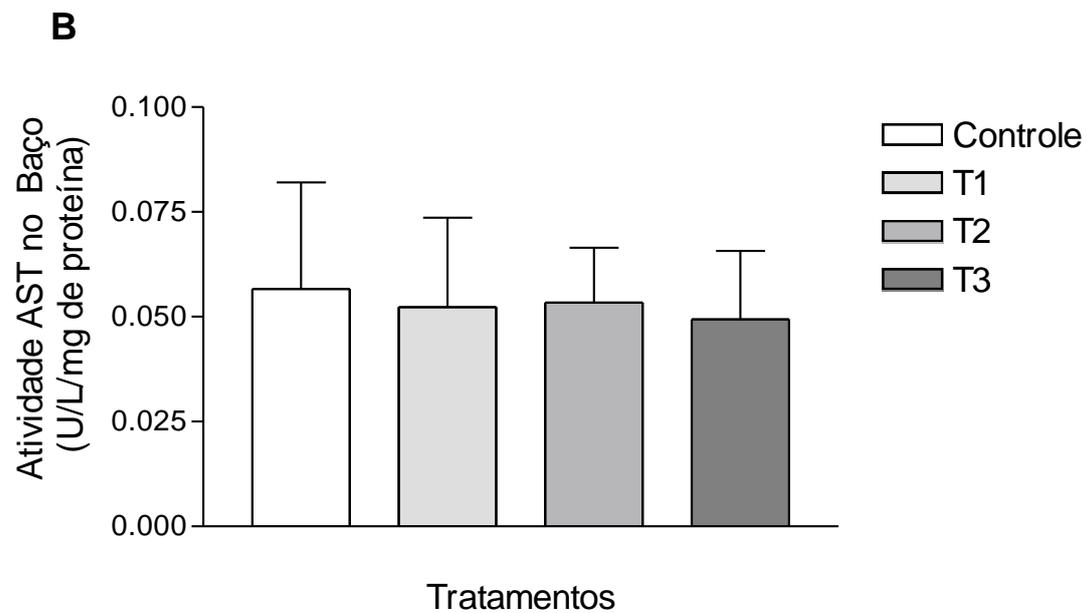
Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho). Os valores são expressos como média \pm DP (Desvio Padrão) $n=10$ para cada tratamento. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle.

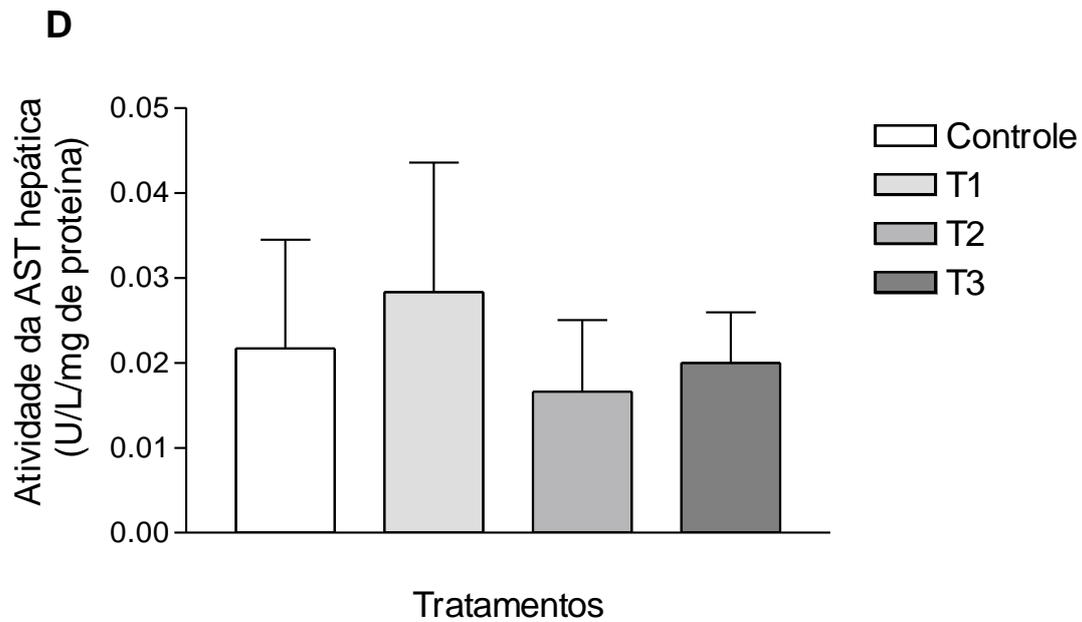
Diversos estudos demonstram que o alho tem potencial para interferir nos processos metabólicos dos diversos substratos como carboidratos, proteínas e lipídeos. (LEE et al. 2012; XIANG; LIU, 2002; LUO et al., 2008; ALY et al., 2008; METWALLY, 2009). Considerando possíveis alterações metabólicas induzidas pela suplementação com o alho também foram realizadas as avaliações das atividades das enzimas alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato-aminotransferase (AST) em diferentes tecidos: rim, baço,

fígado e músculo de juvenis de jundiá. Estas são enzimas estão envolvidas no metabolismo de aminoácidos em todos os organismos. Nas figuras 7 e 8 é possível observar que não houve variação significativa ($p>0,05$) para as atividades de AST e ALT nos tecidos do rim, baço, músculo e fígado nos tratamentos com as diferentes concentrações de extrato de alho na alimentação de *R. quelen* comparando-os com o grupo controle. A atividade da AST e da ALT nos diferentes tecidos está relacionada ao metabolismo (síntese e degradação) de aminoácidos, e conseqüentemente a disponibilidade dos mesmos para a síntese de proteínas ou para produção de energia. O processo de síntese de proteínas é extremamente importante durante o crescimento dos animais, pois o ganho de massa muscular é diretamente proporcional ao aumento do conteúdo de proteína presente na carne. O fato de a atividade das enzimas AST e ALT não terem sido alteradas em quaisquer dos tecidos estudados pode estar relacionado a ausência de efeito da suplementação com alho no crescimento e ganho de peso dos animais suplementados, reforçando que o alho, nas condições experimentais deste trabalho, não atua como promotor de crescimento para juvenis de jundiá.

Figura 7 – Atividade da aspartato-aminotransferase (AST) no rim (A), baço (B), músculo (C) e fígado (D) de jundiás.

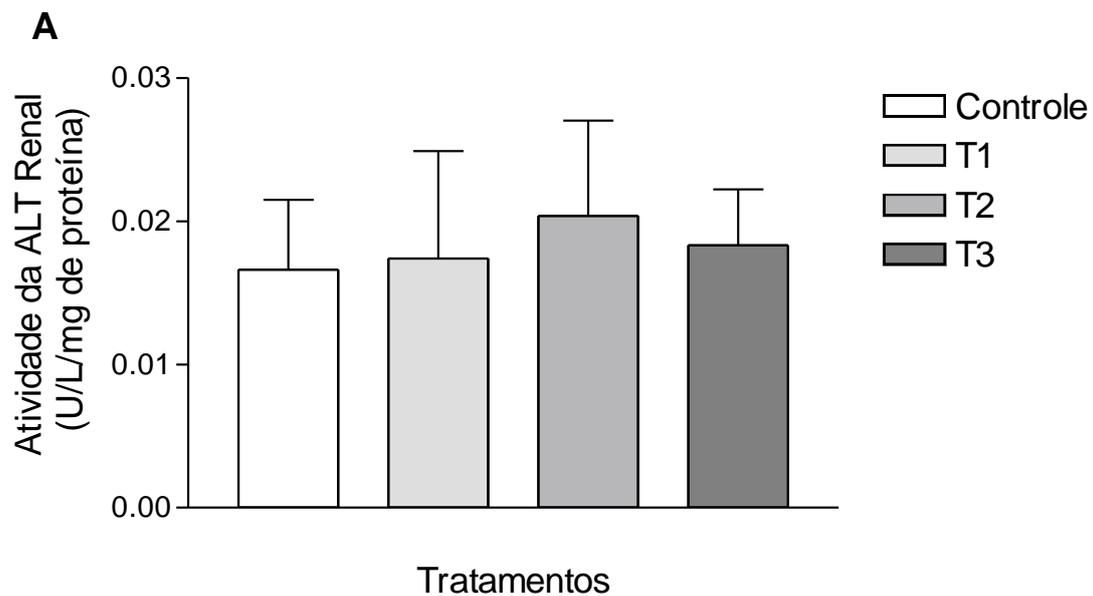


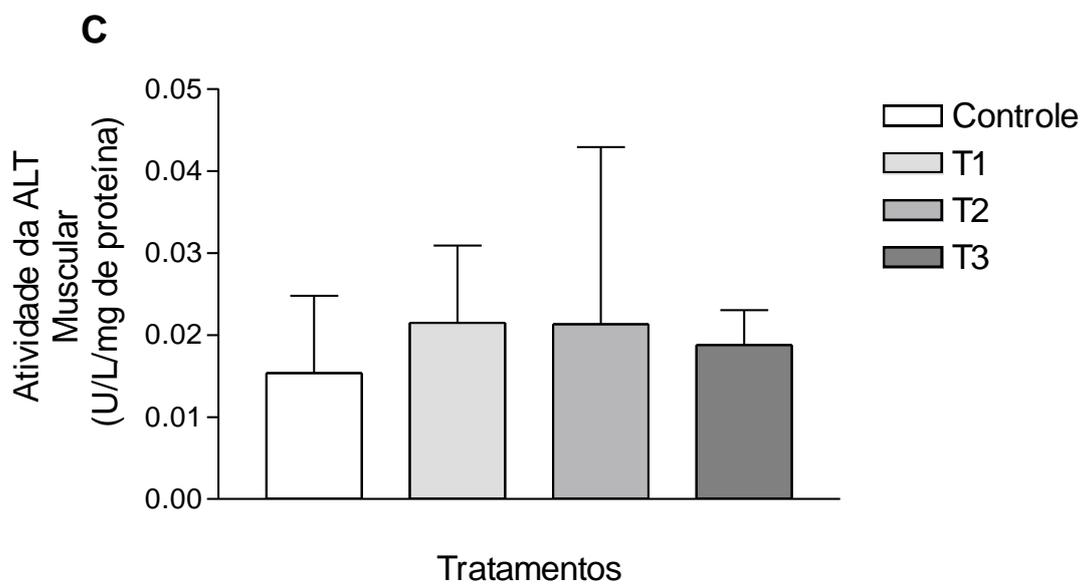
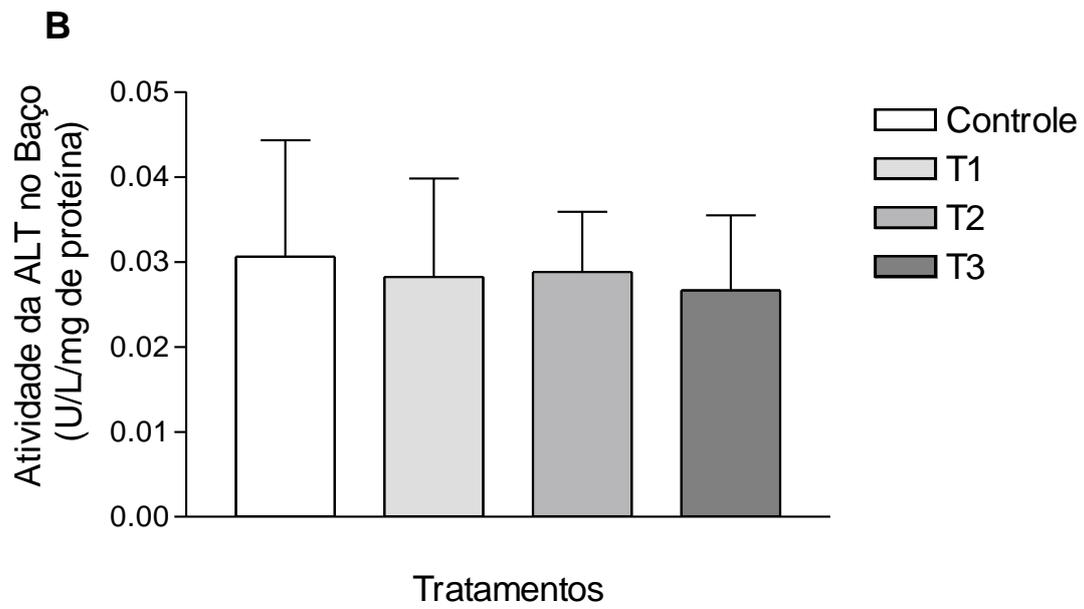


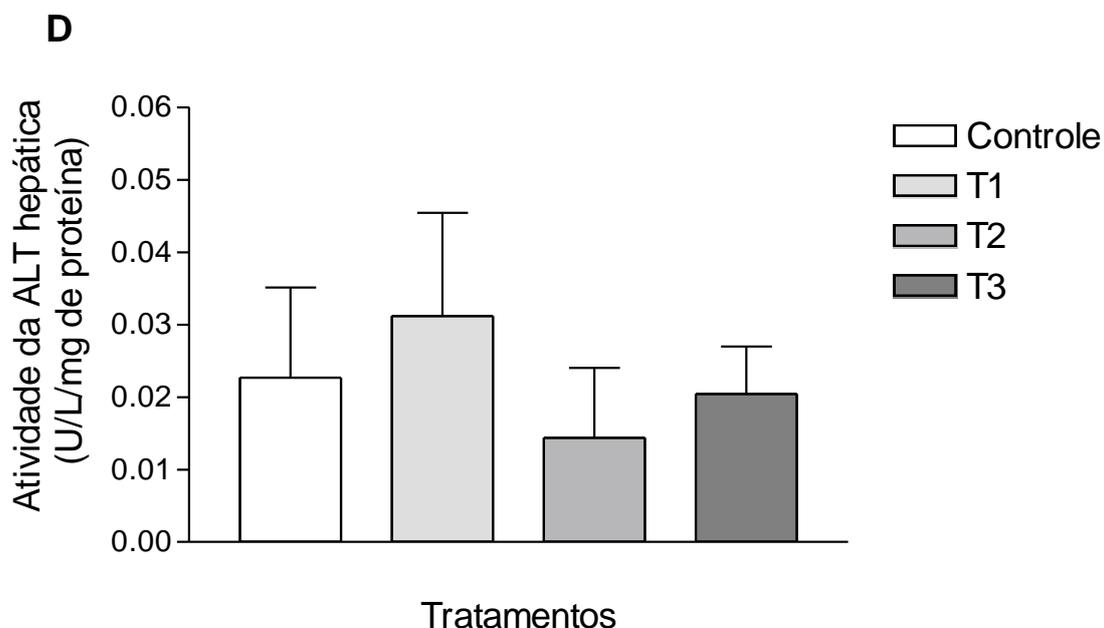


Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho). Os valores são expressos como média \pm DP (Desvio Padrão) $n=10$ para cada tratamento.

Figura 8 – Atividade da alanina-aminotransferase (ALT) no rim (A), baço (B), músculo (C) e fígado (D) de jundiás.







Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho). Os valores são expressos como média \pm DP (Desvio Padrão) $n=10$ para cada tratamento.

Além das avaliações da AST e ALT nos tecidos, também foram realizadas as avaliações das atividades destas enzimas no plasma. Estas são enzimas intracelulares relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e indiretamente à síntese de proteínas nos tecidos. Quando acontece qualquer tipo de lesão (injúria) tissular ocorrerá a liberação de uma quantidade maior destas enzimas para a corrente sanguínea, elevando os seus níveis séricos (ALVES, 2003). Devido a esta característica e o fato delas serem encontradas em diversos tecidos, tanto a AST quanto a ALT podem ser utilizadas como marcadores de dano ou de toxicidade celular. Como pode observado na tabela 4, não houve diferença estatística para os valores de AST e ALT no plasma dos animais suplementados com extrato de alho comparados com o grupo controle sugerindo ausência de citotoxicidade para as concentrações de extrato de alho de 0,5, 2,5 e 5%.

Resultados semelhantes foram encontrados por Li et al. (2008), em estudos realizados com pó de alho (0,3, 0,45, e 0,6 g de pó de alho por kg de consumo de dieta seca) em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) que não apresentaram diferença significativa para os parâmetros de AST e ALT em todos os tratamentos em comparação com o controle. Já Shalaby, Khattab e Abdel Rahman (2006) em estudos com *O. niloticus*, alimentados com alho 10, 20, 30 e 40 g/kg de ração, encontraram diferenças significativas para as

atividades de AST e ALT no plasma, sendo que as atividades de ambas as enzimas foram reduzidas à medida que as concentrações de alho na ração aumentaram. Estes dados indicam que as concentrações de alho utilizadas estão diretamente relacionadas à possíveis efeitos celulares e alterações nas atividades séricas destas enzimas. Ainda, estudos demonstram que os valores basais de AST e ALT podem apresentar grande variabilidade na mesma espécie. Isso pode ser devido a diferenças na idade, sexo e condição fisiológica dos animais bem como na metodologia utilizada para determinação da atividade enzimática (LEE; GAO, 2012).

Tabela 4 – Atividade da AST e ALT no plasma de *R. quelen*.

	C	T1	T2	T3
AST				
(U/L)	0,34128 ± 0,00010	0,34130 ± 0,00006	0,34131 ± 0,00007	0,34131 ± 0,00016
ALT				
(U/L)	0,27143 ± 0,00017	0,27142 ± 0,00015	0,27146 ± 0,00012	0,27154 ± 0,00030

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho).

Além dos efeitos do alho como estimulante de apetite e promotor de crescimento em aquicultura, alguns estudos vêm avaliando o potencial do uso do alho como antioxidante em peixes (CHAGAS, et al., 2012; HEINERMAN, 1999). Sabe-se que as condições de cultivo influenciam no equilíbrio fisiológico dos animais e qualquer condição ou injúria que altere a sua homeostasia pode provocar um aumento da produção de espécies reativas (EROs) que levam ao processo de estresse oxidativo celular danificando membranas, proteínas e DNA e podendo levar à morte das células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A presença de certos poluentes, substâncias químicas, metais pesados, patógenos e doenças bem como variações ambientais nos sistemas de cultivo podem induzir a peroxidação lipídica nos tecidos dos peixes, levando a danos celulares e teciduais com consequente prejuízo do desenvolvimento dos animais (NAKANO et al., 1999; TANAKA et al., 2002).

Assim, o uso de substâncias com atividade antioxidante na ração pode ser uma alternativa para melhorar a condição fisiológica dos peixes e sua capacidade de resposta frente à agentes agressores e estresses ambientais durante o cultivo. A fim de avaliar se a suplementação com extrato de alho

melhorou o status antioxidante dos juvenis de jundiá, foram estudadas a atividade da catalase e a peroxidação lipídica em diferentes tecidos.

Estes marcadores foram escolhidos em função da importância das reações que participam e dos danos ocasionados. A catalase faz parte do sistema de defesa antioxidante enzimático e catalisa a neutralização do peróxido de hidrogênio, considerado uma espécie reativa altamente deletéria para as estruturas celulares, porque participa das reações de Fenton e Haber-Weiss gerando radical hidroxil. Já a peroxidação lipídica consiste da reação de oxidação dos lipídeos de membrana por espécies reativas, alterando a estrutura das membranas biológicas e levando a sérios danos no funcionamento das células. Em peixes, este marcador pode ser considerado especialmente importante devido à constituição das membranas biológicas destes animais, ricas em lipídeos poli-insaturados, constituídos de ácidos graxos. Sendo que os ácidos graxos poli-insaturados constituem um dos componentes celulares mais atingidos pelo ERO (Espécie Reativa de Oxigênio).

Na tabela 5 pode ser verificado que a atividade da catalase no rim e no baço não variou significativamente ($p > 0,05$) entre os tratamentos comparados com o controle. Já no fígado, a atividade da catalase apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) para o grupo de 2,5% de extrato de alho na alimentação em comparação com os grupos que receberam dietas com 0, 0,5 e 5% de extrato de alho.

Tabela 5 - Atividade da Catalase (mmol de peróxido de hidrogênio degradado. mg^{-1} de proteína. min^{-1}) nos tecidos (fígado, rim e baço) de *R. quelen*.

Atividade da Catalase (mmol $\text{H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ proteína/min)	Tratamentos			
	C	T1	T2	T3
Fígado	0,24 \pm 0,06	0,26 \pm 0,06	0,17 \pm 0,08*	0,21 \pm 0,05
Rim	0,06 \pm 0,02	0,07 \pm 0,04	0,06 \pm 0,02	0,08 \pm 0,03
Baço	0,03 \pm 0,02	0,03 \pm 0,03	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,02

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho). Os valores são expressos como média \pm DP n=10 para cada tratamento. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle.

Reduções na atividade da catalase no plasma foram observadas com Mohebbi et al. (2011) que realizaram estudos com *Oncorhynchus mykiss* com

ingestão de alho de 10, 20 e 30 g/kg de ração na dieta em comparação com todos os grupos incluindo o controle, já a ingestão de alho com 40 e 50 g/kg de ração promoveu o aumento na atividade da catalase plasmática. Ainda, Li et al. (2008), encontraram resultados semelhantes em *Oncorhynchus mykiss* com dietas suplementadas com alho, em que a atividade da catalase no plasma aumentou significativamente em relação ao grupo controle indicando variabilidade de valores dentro da mesma espécie. Aumentos de atividade de catalase hepática também foram relatados por Metwally (2009) em estudo com *O. niloticus* com todos os tratamentos com alho (alho natural 40 g/kg de ração; cápsulas de óleo de alho 250 mg/kg de ração e comprimidos de alho em pó 32 g/kg de ração) em comparação com o grupo controle. Estes resultados indicam que ainda não se tem clareza em relação as quantidades de alho a serem usadas, como também a interferência de outros fatores, como temperatura, qualidade de água, idade dos animais entre outros em termos de efeito antioxidante.

Como pode ser observado na tabela 6 a suplementação com alho não alterou a lipoperoxidação nos tecidos do rim, baço, fígado e músculo, em nenhum dos tratamentos com extrato de alho (0,5, 2,5 e 5%) comparado ao grupo controle.

Tabela 6 – Lipoperoxidação – LPO (nmol de MDA/mg de proteína) em tecidos (baço, fígado, rim e músculo) de *R. quelen*.

LPO (nmol MDA/mg de proteína)	Tratamentos			
	C	T1	T2	T3
Baço	0,0031 ± 0,0019	0,0026 ± 0,0006	0,0028 ± 0,0016	0,0026 ± 0,0011
Fígado	0,0272 ± 0,0003	0,0273 ± 0,0001	0,0271 ± 0,0002	0,0275 ± 0,0003
Rim	0,0237 ± 0,0003	0,0236 ± 0,0002	0,0235 ± 0,0002	0,0238 ± 0,0003
Músculo	0,0114 ± 0,0003	0,0116 ± 0,0005	0,0116 ± 0,0005	0,0113 ± 0,0002

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho). Os valores são expressos como média ± DP; n=10 para cada tratamento.

O aumento do estresse oxidativo celular leva a lipoperoxidação (LPO), que pode induzir alterações na permeabilidade das membranas celulares, alterando o fluxo iônico e fluxo de outras substâncias, sendo uma das maiores

causas de injúria e morte celular, com as quais muitas patologias estão conectadas (FONSECA et al., 2002). No presente trabalho, a suplementação com alho na ração não influenciou o status antioxidante nos tecidos dos juvenis de jundiá uma vez que não foram observadas alterações nos níveis de peroxidação lipídica apesar da redução da atividade da catalase no fígado dos animais. Segundo a literatura (SANTOS et al., 2009; LEE; GAO, 2012; OLIVEIRA et al., 2015) o fato do alho possuir atividade antioxidante a sua suplementação na ração daria melhores condições fisiológicas aos peixes melhorando sua capacidade de responder a agentes agressores ambientais e patógenos, o que não foi verificado nesse estudo.

É importante ressaltar que os estudos sobre a influência da manipulação dietética sobre a atividade antioxidante em peixes, especialmente em espécies como o *R. quelen* ainda são escassos e pouco se sabe sobre como diferentes dietas podem alterar o status antioxidante dos animais e conseqüentemente sua homeostasia corporal. Com base na revisão de literatura da área, este é o primeiro relato sobre a influência do extrato de alho na atividade antioxidante em tecidos de juvenis de jundiá em condições experimentais.

5.1.4 Parâmetros Hematológicos

A partir das avaliações hematológicas é possível fazer diversas análises que demonstram as condições fisiológicas e possíveis alterações metabólicas decorrentes de diferentes condições de cultivo em organismos aquáticos (LAZZARI et al., 2011). Sendo assim, é possível avaliar o estado de saúde dos animais e monitorar respostas à situações de estresse que podem ser causadas por poluentes, herbicidas, condições de manejo inadequadas, densidade entre outros (KLINGER et al., 1996; BARCELLOS et al., 2004; CAMARGO et al., 2005; CRESTANI et al., 2006).

Na tabela 7 é possível observar que o extrato de alho não influenciou o valor de hematócrito de nenhum dos grupos de tratamento quando comparado ao grupo controle, no período de tempo estudado. Por outro lado, a concentração de hemoglobina apresentou uma redução significativa no tratamento 3 (5,0% de extrato de alho na ração) comparada aos demais tratamentos e ao grupo controle. Também foi observado um aumento

significativo ($p < 0,05$) no número total de eritrócitos em todos os tratamentos em relação ao grupo controle.

Os eritrócitos são as células mais numerosas do sangue, que contêm o pigmento hemoglobina com função de transporte de oxigênio e gás carbônico (RANZANI-PAIVA, SILVA-SOUZA, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2009). Qualquer deficiência no número de eritrócitos ou na concentração de hemoglobina poderá refletir em uma falta de O_2 nos tecidos e prejudicar o funcionamento adequado das células (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Observando os resultados obtidos com a suplementação com alho, o aumento do número de eritrócitos sem alteração no hematócrito dos peixes alimentados com dietas contendo extrato de alho é um fator positivo, já que os mesmos são responsáveis pelo transporte de O_2 e CO_2 no sangue, representando maior disponibilidade de células para o transporte de gases.

Tabela 7 - Variáveis hematológicas de *R. quelen* submetidos à dieta com diferentes concentrações de extrato de alho.

Variáveis Hematológicas	Tratamentos			
	C	T1	T2	T3
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	1,51 ± 1,67	1,81 ± 2,29*	2,31 ± 0,93*	1,80 ± 2,93*
Hematócrito (%)	29,20 ± 5,20	28,50 ± 6,40	24,70 ± 5,70	27,90 ± 4,70
Hemoglobina (g/dL)	6,56 ± 0,69	6,61 ± 1,60	6,24 ± 1,48	3,66 ± 1,47* #
VCM (fL)	194,32 ± 32,84	161,29 ± 42,22	119,56 ± 53,54*	168,11 ± 42,54
HCM (pg)	43,92 ± 6,52	37,00 ± 11,01	29,73 ± 8,93	22,98 ± 11,90*
CHCM (g/dL)	22,87 ± 2,99	22,88 ± 2,41	27,69 ± 11,02	14,12 ± 7,29* #

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho); T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho); VCM (Volume Corpuscular Médio); HCM (Hemoglobina Corpuscular Média); CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média); Os valores são expressos como média ± DP; n=10 para cada tratamento. *Indicam diferença significativa ($p < 0,05$) comparados com o grupo controle. #Indicam diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com T1 e T2.

Além dos valores absolutos de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina, os índices sanguíneos/hematimétricos também são particularmente importantes para avaliação das condições de saúde dos peixes e podem ser utilizados para o diagnóstico de diversas alterações hematológicas, dentre elas a anemia. Diante disso, foram realizados os cálculos dos índices para Volume

Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Como pode ser observado na tabela 7, ocorreu redução significativa do VCM no tratamento 2 comparado ao grupo controle. Ainda, os parâmetros HCM e CHCM apresentaram reduções no tratamento 3 quando comparados ao grupo controle e aos demais tratamentos. As reduções observadas dos índices hematimétricos HCM e CHCM especialmente no tratamento 3 associado à redução do conteúdo de hemoglobina neste tratamento sugere o estabelecimento de um quadro de anemia normocítica (sem alteração do VCM) e hipocrômica (redução da concentração de hemoglobina, nos eritrócitos) podendo acarretar um comprometimento da capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Os valores para parâmetros sanguíneos variam enormemente entre as diversas espécies de peixes e também já foram observadas variações significativas dentro da mesma espécie, o que dificulta o estabelecimento de valores de referência para comparações, considerando estágio de desenvolvimento do animal, condições fisiológicas e de manutenção dentre outras. Shalaby, Khattab e Abdel Rahman (2006) observaram aumento significativo na contagem de eritrócitos e no conteúdo de hemoglobina em *O. niloticus* alimentados com dietas contendo diferentes níveis de alho (20, 30, e 40 g/kg de ração) enquanto que os valores de hematócrito só aumentaram significativamente no tratamento com 20 g de alho/kg de ração. Além disso, as variações dos índices hematimétricos neste estudo reforçam a ideia da variabilidade dos parâmetros sanguíneos dentro de uma mesma espécie, sendo que a suplementação com concentrações mais elevadas de alho na ração (30 e 40 g/kg) promoveu uma redução significativa dos índices hematimétricos dos animais enquanto que nas concentrações mais baixas avaliadas (10 e 20 g/kg) foi observado um aumento nos valores de CHCM e VCM, respectivamente.

Por outro lado, Bard et al. (2006) em estudos com *R. quelen* alimentados com alho com 3, 6, 9 e 12 g/kg de ração não observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) para a contagem de hemáceas. Já para os valores médios de hematócrito foram observados aumentos significativos ($P < 0,05$) para os tratamentos contendo 3 e 12 g/kg de alho na ração em relação aos

demais tratamentos e o grupo controle. Observa-se que, com a mesma espécie de peixe os índices hematológicos podem ser diferentes e influenciados pelas condições do meio onde os animais se encontram e do tipo de dieta a que são submetidos, por isso a necessidade de estabelecer mais estudos referente ao uso do alho na ração, comparando idade, sexo e parâmetros de qualidade da água.

Além das hemácias, o sangue também contém células de defesa, os leucócitos, sendo que este grupo é constituído por neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos. Estas células utilizam as vias sanguíneas para realizar o monitoramento de possíveis infecções ou injúrias teciduais (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

A fim de verificar se o extrato de alho melhora a produção e ou ação das células de defesa dos peixes, foram avaliados a contagem total e diferencial de células leucocitárias e trombócitos. Na contagem total, não foram observadas alterações significativas na contagem de trombócitos e leucócitos comparado ao grupo controle (por exemplo, para leucócitos totais, a cada 1000 células contadas 37,77 eram leucócitos). As porcentagens das células individuais foram calculadas a partir do número total de células contadas no esfregaço (2000 células). A contagem diferencial de leucócitos para linfócitos, neutrófilos e células imaturas também não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle (Tabela 8). Já em relação ao conteúdo de monócitos e basófilos o tratamento 1 (0,5% de alho) apresentou redução significativa quando comparado aos tratamentos 2 e 3 e ao grupo controle. Além disso, no grupo dos basófilos foi observado um aumento significativo na contagem diferencial para os tratamentos 2 e 3 (2,5% e 5% de alho) comparados ao tratamento 1 (0,5% de alho) e ao grupo controle.

Tabela 8 – Contagem total de leucócitos e trombócitos e contagem diferencial de células de defesa do sangue de *R. quelen*.

	C	T1	T2	T3
Trombócitos (%)	2,63 ± 1,11	2,17 ± 0,54	2,20 ± 0,54	2,70 ± 0,85
Leucócitos totais (%)	3,79 ± 1,55	2,60 ± 1,13	3,67 ± 0,28	3,74 ± 0,64
Linfócitos (%)	41,66 ± 19,36	53,04 ± 2,68	46,95 ± 14,84	65,57 ± 13,36
Células Imaturas (%)	4,63 ± 2,24	3,11 ± 2,68	2,48 ± 1,89	2,80 ± 1,92
Neutrófilos (%)	31,06 ± 15,50	34,65 ± 13,04	28,97 ± 10,94	15,84 ± 6,90
Monócitos (%)	21,18 ± 10,30	8,12 ± 6,48* #	15,78 ± 9,54	9,95 ± 6,37
Basófilos (%)	1,47 ± 3,49	1,08 ± 1,56#	5,88 ± 4,12* [@]	5,84 ± 3,53* [@]

C (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho). Os valores são expressos como média ± DP; n=10 para cada tratamento. Significativo para *p ≤ 0,05 em relação ao grupo controle; Significativo para #p ≤ 0,05 em relação aos tratamentos T2 e T3; Significativo para [@]p ≤ 0,05 em relação ao tratamento T1.

Na tabela 8 ainda é possível verificar que além da diminuição significativa do número de monócitos no tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho na ração, também houve reduções nos demais tratamentos que receberam extrato de alho se comparados com o grupo controle, indicando uma possível redução no número de células de defesa no sangue relacionadas à resposta imune primária, já que os monócitos têm como função participar dos processos de fagocitose e de resposta inflamatória frente à patógenos, especialmente nos tecidos. Por outro lado, em relação à contagem dos basófilos, o aumento no número de células se associou com o aumento da concentração de alho na ração. Uma vez que estas células possuem histamina em seus grânulos e possivelmente estão relacionadas à processos alérgicos em peixes, pode-se sugerir um estudo mais detalhado que examine a possibilidade do alho atuar como alérgeno no organismo dos animais.

Em relação ao número de leucócitos totais, o estudo de Bard et al. (2006) com *R. quelen* alimentados com alho com 3, 6, 9 e 12 g/kg de ração também não observaram diferenças significativas (p>0,05) na contagem total de leucócitos. Por outro lado, Ndong e Fall (2007) observaram que a suplementação de juvenis híbridos de tilápia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) com uma dieta suplementada com alho, após duas e quatro semanas resultaram em aumentos significativos na contagem total de leucócitos de 98,72 e 93,87% para dieta 0,5% e de 23,62 e 43,67% para dieta 1%, respectivamente.

Baseado nos dados da literatura de suplementação com extrato de alho e dos resultados do presente trabalho pode-se sugerir que os efeitos do alho sobre a produção de células de defesa podem ser considerados bastante variáveis e dose dependentes uma vez que concentrações mais elevadas de alho na ração parecem ter um efeito menor no estímulo da produção de leucócitos em peixes. Ainda, os resultados reforçam a hipótese de que dose, tempo e estágio de desenvolvimento dos animais são fatores determinantes para a observação de efeitos positivos nestes parâmetros como já observado para os demais parâmetros avaliados no presente trabalho.

5.1.5 Parâmetros Imunes

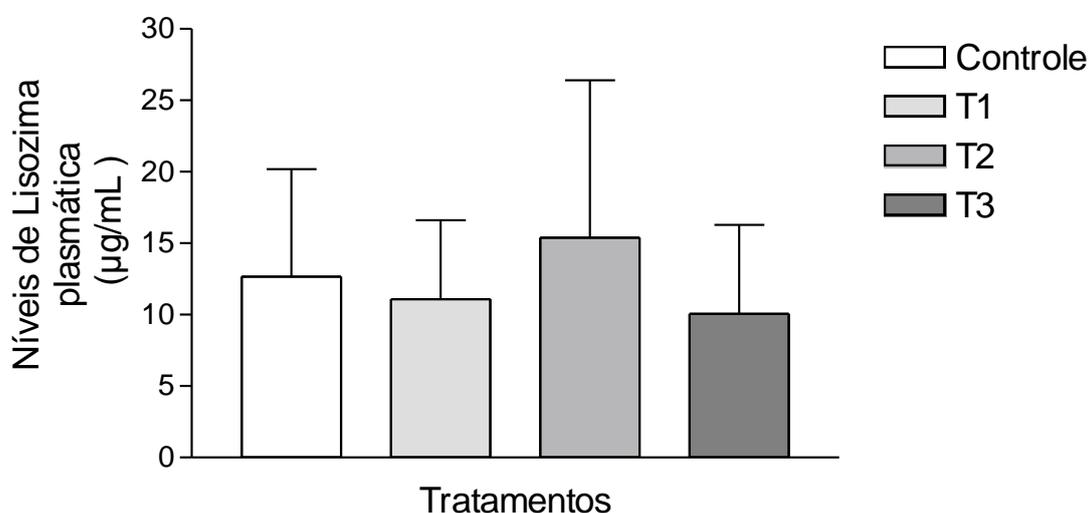
Os peixes possuem um sistema imune bastante complexo, composto pelo sistema imune inato e o sistema imune específico ou adquirido (IWANA; NAKANISHI, 1996). Dentre os diferentes mecanismos de defesa não específicos dos peixes, o processo de fagocitose é extremamente importante uma vez que atua sobre agentes patogênicos que ultrapassam as barreiras superficiais de defesa. Durante este processo, tanto no sangue quanto nos tecidos, ocorre o englobamento dos patógenos pelos leucócitos, em especial neutrófilos e monócitos, e a digestão dos microrganismos pela ação das enzimas hidrolíticas presentes nos fagossomos/vacúolos digestivos. Dentre as enzimas hidrolíticas encontramos a lisozima, produzida em maior quantidade durante as infecções (PAULSEN et al., 2003).

Para verificar se o extrato de alho teria algum efeito sobre a eficiência da fagocitose dos neutrófilos, foi realizada a análise do conteúdo de lisozima no plasma. No presente trabalho as dietas com 0,5, 2,5 e 5% de extrato de alho na ração não modificaram o conteúdo de lisozima quando comparado com o grupo controle (Figura 9) apesar das alterações observadas na contagem de monócitos e neutrófilos, principais células envolvidas na fagocitose. Esses resultados sugerem que o extrato de alho nessas concentrações para o jundiá não apresentou efeito imunoestimulante.

Por outro lado, o extrato de alho estimulou a atividade da lisozima em juvenis de tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) alimentados com 0,5 g de alho/kg de ração suplementada na dieta dos peixes durante duas e quatro semanas, enquanto que os peixes alimentados com 1 g de alho/kg de ração

não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (NDONG; FALL, 2007). Ainda, Talpur e Ikhwanuddin (2012) em estudos com alevinos de *Lates calcarifer*, demonstraram que a atividade da lisozima aumentou significativamente ($p < 0,05$) para os peixes alimentados com dietas de alho (0 g, 15 g e 20 g/kg de ração) comparados com o grupo controle. Estes resultados reforçam a hipótese de que os efeitos imunoestimulantes do alho estão relacionados às faixas de concentração e tempo de tratamento utilizados nas diferentes espécies.

Figura 9 – Níveis de lisozima plasmática de *R. quelea* após tratamento com diferentes concentrações de extrato de alho.



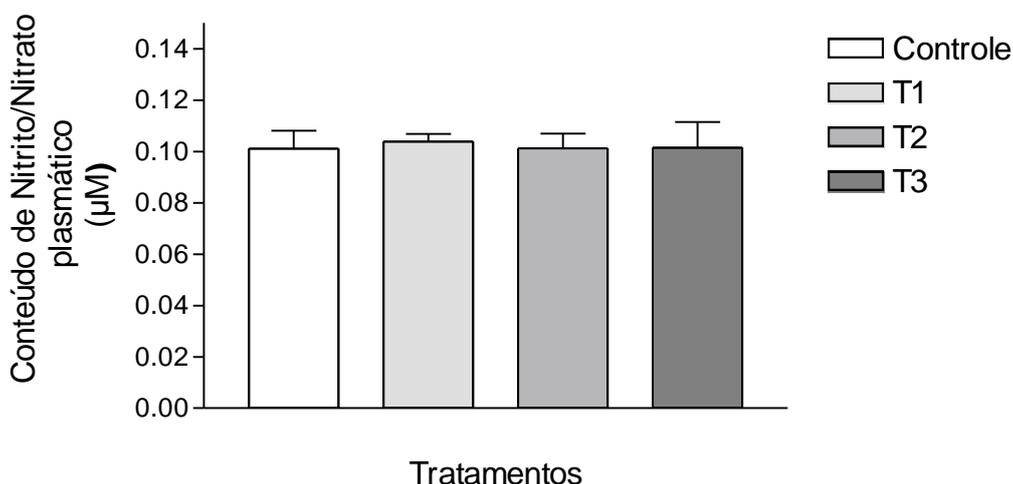
C (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho). Os valores são expressos como média \pm DP (Desvio Padrão); $n=10$ para cada tratamento.

Além da atividade da lisozima durante a fagocitose, ocorre também um aumento na produção de óxido nítrico (NO) pelas células de defesa (PAULSEN et al., 2003). O óxido nítrico é uma molécula pequena e relativamente instável. É um radical livre, classificado como espécie reativa de nitrogênio (ERN) que, dependendo da sua quantidade pode ter efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo (NATHAN; HIBBS, 1991). O NO é considerado um dos principais mediadores citotóxicos de células imunes ativadas e é produzido em quantidades significativas durante a resposta inflamatória por macrófagos e outras células do sistema imune que expressam a isoforma da enzima iNOS. O NO como radical livre reage com o ânion superóxido e forma peroxinitrito um

potente oxidante que pode destruir os microrganismos invasores, se tornando assim, um fator importante na resposta imune dos peixes. O NO gerado nestas circunstâncias é liberado dos macrófagos e atua sobre as células ou microrganismos alvo ocasionando danos oxidativos letais (SECOMBES, 2001; NATHAN; HIBBS, 1991; PELIELO, 2011). Em presença de oxigênio e oxihemoglobina este radical é rapidamente degradado (meia-vida extremamente curta, de 4 a 6 segundos no plasma) produzindo nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) que são utilizados como marcadores para a determinação da produção de NO e da resposta imune (ASL et al., 2008).

No presente estudo, os valores do conteúdo de nitrito/nitrato para os jundiás suplementados com extrato de alho não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos e o grupo controle, como pode ser observado na figura 10. Assim, os resultados indicam que o extrato de alho não influenciou a produção de óxido nítrico e de espécies derivadas de nitrogênio, fator importante na resposta imunológica nos peixes, indicando que o extrato de alho nessas concentrações não tem interferência na resposta imune em condições basais.

Figura 10 - Conteúdo de nitrito/nitrato (μM) no plasma de *R. quelen* suplementados com diferentes concentrações de extrato de alho na ração.



Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho). Os valores são expressos como média \pm DP (Desvio Padrão); $n=10$ para cada tratamento.

5.2 PARTE II – PEIXES DESAFIADOS COM O PARASITA *Ichthyophthirius multifiliis*

O *I. multifiliis* é um ectoparasita, da classe *Oligohymenophorea* responsável por grandes prejuízos na piscicultura de água doce a nível mundial. Vale ressaltar que a ictiofitiríase é de difícil tratamento, principalmente em viveiros muito grandes, pois o grande volume de água dificulta o tratamento, que deve ser feito em tanques especiais para tal finalidade (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008; EIRAS; TAKEMOTO; PAVANELLI, 2010). Por isso a importância de se encontrar formas de prevenção ao parasita.

Devido à baixa taxa de sobrevivência dos peixes desafiados com o parasita *I. multifiliis*, não foram realizadas as análises bioquímicas e a análise estatística para os parâmetros do estudo. Para estes animais foi realizada apenas a caracterização hematológica e histológica qualitativa.

5.2.1 Parâmetros de Qualidade de Água

Na tabela 9 é possível observar os parâmetros da qualidade de água para o sistema de recirculação dos peixes desafiados com o parasita, visto que a temperatura foi mantida mais baixa, justamente para a infestação do parasita. Além disso, neste sistema não se utilizou água com salinidade, pois o sal inibe o desenvolvimento do *I. multifiliis* (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

Tabela 9 – Parâmetros da qualidade da água durante o período do desafio com o parasita para o sistema de circulação.

	Temperatura (°C)	O ₂ (mg/L)	NH ₃ (mg/L)	Salinidade (‰)	pH
Sistema (desafio)	22,33 ± 2,00	5,0 ± 0,20	0,21 ± 0,10	0,00	7,10 ± 0,10

O₂ – Oxigênio; NH₃ – Amônia.

5.2.2 Parâmetros de Sobrevivência e Contagem dos Parasitas Infestados

Para o desafio com o parasita *I. multifiliis*, foram utilizados 10 peixes de cada grupo de tratamento mais o grupo controle. Após realizada a infestação experimental os animais foram acompanhados e a mortalidade avaliada. Para esses peixes a taxa de mortalidade foi bastante elevada como pode ser

observado na tabela 10, sendo que o grupo controle teve a maior taxa de sobrevivência com 30% dos animais.

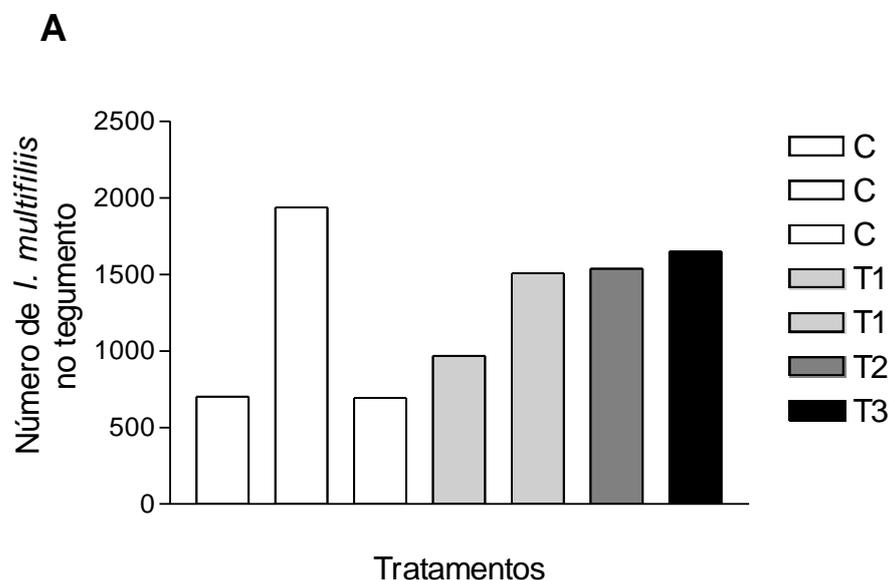
Para os animais que sobreviveram foram realizadas a contagem da infestação do *I. multifiliis*, em uma dimensão de 10 cm² (abaixo da nadadeira dorsal esquerda) e também do segundo arco branquial de cada peixe. Os resultados da contagem são apresentados na figura 11, na qual é possível observar que o grau de infestação foi semelhante nos grupos dos diferentes tratamentos comparando-os com o grupo controle (Figura 12).

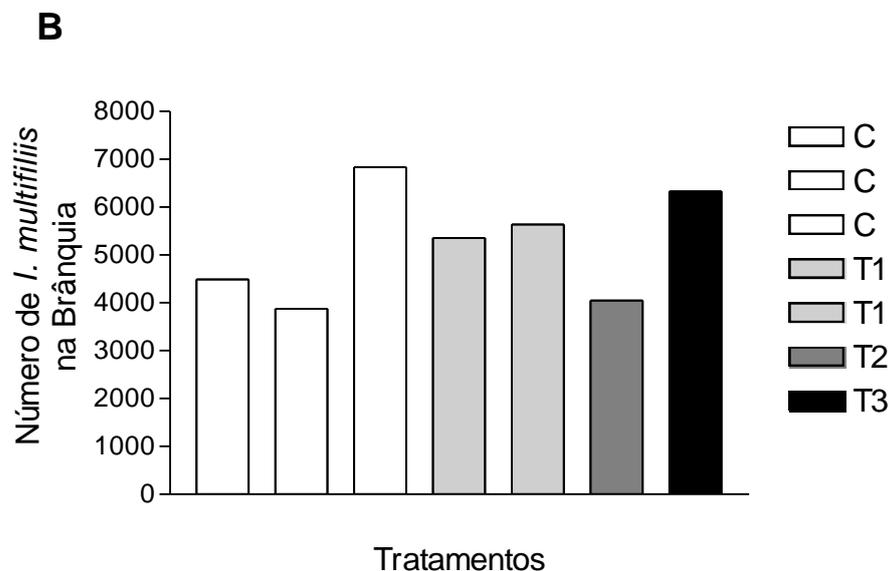
Tabela 10 – Taxa de sobrevivência e mortalidade dos peixes desafiados com o parasita *I. multifiliis*.

	C	T1	T2	T3
Sobrevivência (%)	30	20	10	10
Mortalidade (%)	70	80	90	90

T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho).

Figura 11 – Contagem do número de parasitas (*I. multifiliis*) por juvenil de *R. quelen* (A) na superfície da pele (10 cm²); (B) no segundo arco branquial.





Controle (Testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho). Cada barra representa um animal sobrevivente ao desafio com o parasita.

Figura 12 – Juvenil de *R. quelen* infestado pelo parasita *I. multifiliis* (pontos brancos).



Fonte: Amorin, 2016.

Com base nos dados obtidos do desafio, pode-se afirmar que o extrato de alho, nas concentrações e tempo utilizados neste estudo, não apresentou efeito imunoestimulante nos peixes desafiados com o parasita *I. multifiliis*, uma vez que a mortalidade foi alta em todos os tratamentos inclusive no grupo controle.

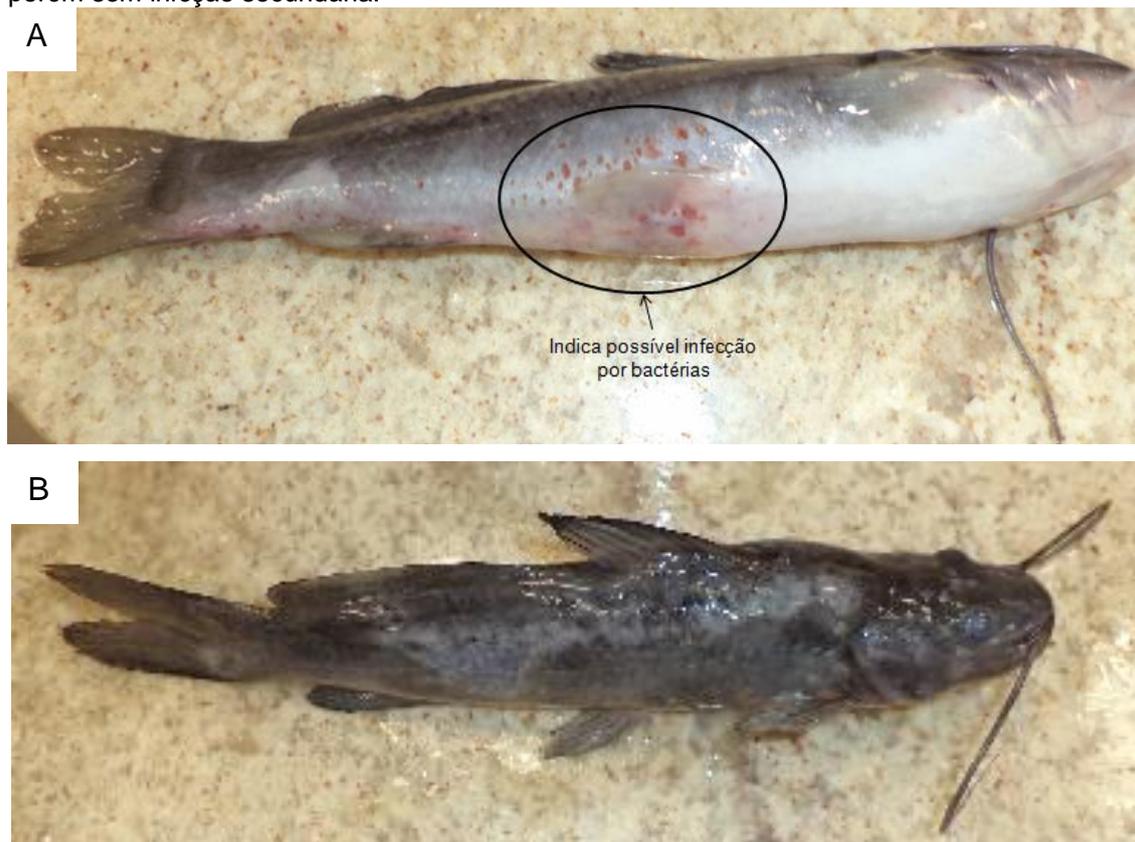
Buchmann et al. (2003) realizaram testes *in vitro* para avaliar os efeitos do extrato de alho sobre a fase teronte infecciosa e a fase tomonete do parasita *I. multifiliis* sendo que a eficácia do extrato foi comparada com a do verde malaquita³. O extrato de alho na concentração de 62,5 mg/L provocou a morte de terontes após 15 h de exposição *in vitro* indicando que concentrações mais elevadas de extrato de alho são necessárias para provocar a morte das formas infestantes do parasita quando comparado ao verde malaquita (0,1 mg/L) no mesmo período de tempo. Além disso, para promover a morte dos tomontes e impedir o desenvolvimento dos tomitos *in vitro* em 24 h, foi necessária uma concentração de 570 mg/L de extrato de alho, bem mais elevada que a dose usada de verde malaquita (0,15 mg/L) reforçando que o extrato de alho pode ser efetivo no combate ao parasita mas que seriam necessários esquemas de tratamento repetitivos para sistemas de cultivo ou doses mais elevadas do extrato para obtenção de resultados positivos.

Apesar de não ter sido verificado um efeito protetor do alho contra a infestação do parasita *I. multifiliis*, foi observado que os animais suplementados com a ração contendo extrato de alho não apresentaram lesões secundárias nem contaminação bacteriana secundária à presença do parasita, ocorrências estas verificadas nos animais do grupo controle, conforme a figura 13. Um dos problemas associados à infestação com *I. multifiliis* é que as lesões provocadas pelo parasita na superfície da pele dos peixes servem como porta de entrada para infecções secundárias, geralmente causadas por bactérias oportunistas que se instalam nas lesões e se disseminam pelo resto do corpo do animal (PAVANELLI, 2008). Diante disto, pode-se sugerir que o extrato de alho nas concentrações utilizadas neste estudo possa apresentar um efeito protetor contra infecções bacterianas. Esta hipótese é reforçada, pois em trabalhos realizados com *O. Niloticus* todos os grupos tratados com alho apresentaram níveis mais baixos de mortalidade quando desafiados com *Pseudomonas fluorescens* comparado com 75% de mortalidade do grupo controle (DIAB et al., 2008). Talpur; Ikhwanuddin (2012) também avaliaram efeitos positivos em relação a sobrevivência de *Lates calcarifer*, quando alimentados com alho e

³ A utilização do verde de malaquita é considerado o tratamento mais eficaz para esta doença, mas seu uso foi desencorajado devido à suas propriedades mutagênicas e teratogênicas, portanto este composto é proibido para o uso na aquicultura.

expostos ao desafio com a bactéria *Vibrio harveyi*, sendo que a melhor taxa de sobrevivência foi com o tratamento que recebeu alho 10 g/kg de ração, com sobrevivência de 83,35% em comparação com o controle que foi de 33,3%. Para comprovar esse possível efeito em jundiás, estudos mais específicos *in vitro* e *vivo* com bactérias podem ser desenvolvidos posteriormente.

Figura 13 – (A) *R. quelen* do grupo controle, desafiado com o parasita, com possível infecção bacteriana; (B) *R. quelen* que recebeu dieta com extrato de alho, desafiado com o parasita, porém sem infecção secundária.



Fonte: Amorin, 2016.

5.2.3 Parâmetros Hematológicos

Em relação aos peixes desafiados com o parasita *I. multifiliis*, foram realizadas comparações sobre os parâmetros de leucócitos totais e trombócitos nos animais que sobreviveram ao desafio com os não desafiados. Quando observados os dados da tabela 8 (peixes não desafiados) verificamos um aumento no número de células de defesa dos peixes desafiados com o parasita (Tabela 11). Este resultado indica que mesmo com grande mortalidade dos peixes desafiados foi possível verificar que houve uma tentativa de

resposta de defesa manifestada pelo aumento do número de células de defesa, que são importantes no que tange à atividade fagocítica no sangue.

Atenção também deve ser dada a ausência de eosinófilos, células com função ainda incerta para peixes, mas com evidência de sua participação em processos de defesa contra parasitas em mamíferos e em algumas espécies de peixes (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Tabela 11 – Contagem de leucócitos e trombócitos totais e contagem diferencial de células de defesa do sangue de *R. quelen* após o desafio com o parasita *I. multifiliis*.

	C	T1	T2	T3
Trombócitos (%)	2,1	1,83	2,0	2,9
Leucócitos totais (%)	6,0	8,0	9,9	8,9
Linfócitos (%)	16,1	9,6	10,1	8,4
Cel. Imaturas (%)	39,8	42,7	52	46,9
Neutrófilos (%)	41,2	46,6	36,9	44,1
Monócitos (%)	0,7	0,0	0,0	0,0
Basófilos (%)	2,1	0,9	1	0,6

C (testemunha (três animais)); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de extrato de alho (dois animais)); T2 (Tratamento 2, com 2,5% de extrato de alho (um animal)). T3 (Tratamento 3, com 5% de extrato de alho (um animal)).

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

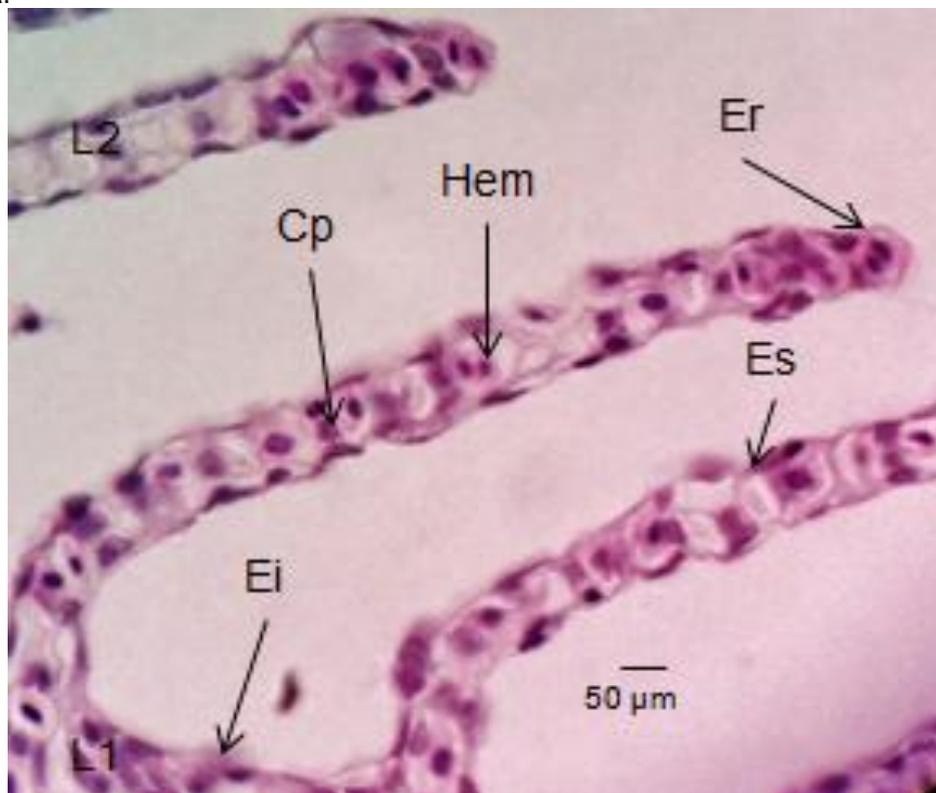
As análises histológicas são uma ferramenta eficiente para o diagnóstico e identificação de alterações ocasionadas em tecidos e órgãos dos peixes. Vários órgãos podem ser utilizados nas análises histológicas, porém considerando o ataque de ectoparasitas em jundiás, como o *I. multifiliis*, os órgãos mais afetados são brânquias e pele (SHEPHARD, 1994; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008). Diante disso, as análises realizadas no presente estudo foram com brânquias e com pele, tanto dos peixes desafiados com o parasita *I. multifiliis* (aqueles que sobreviveram) quanto para os que não foram desafiados.

5.3.1 Análise Histológica de Brânquias

As brânquias são órgãos complexos, multifuncionais e exercem papéis vitais, pois, além de serem o principal meio de trocas gasosas, também estão envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de compostos nitrogenados (MACHADO; FANTA, 2003; BORGES,

2005). Na figura 14 é possível verificar a estrutura normal de brânquia de jundiá não desafiado com o parasita.

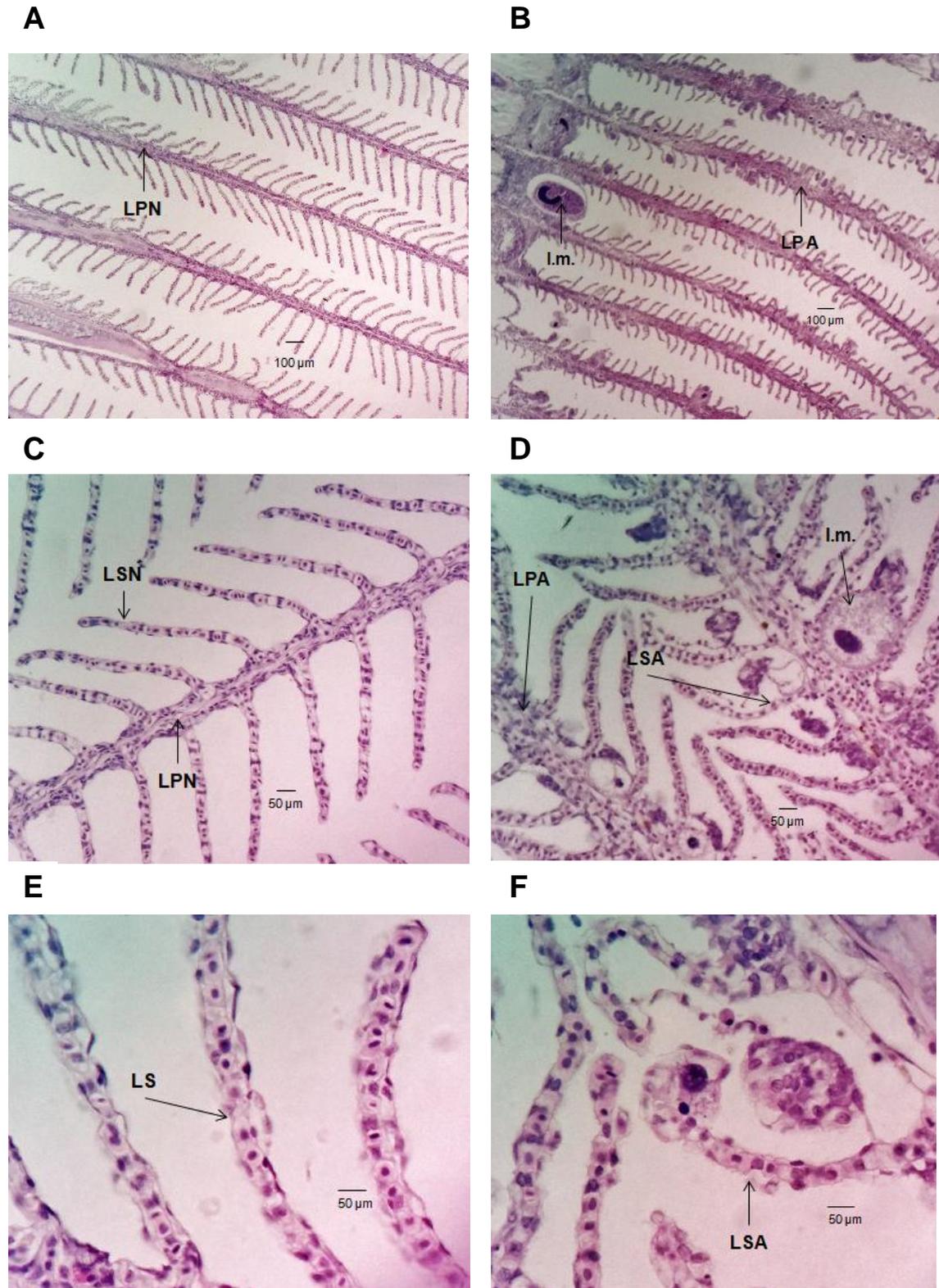
Figura 14 – Histologia representativa de brânquia normal de *R. quelen* não desafiado com o parasita.



Fonte: Amorin, 2016. Legendas: Cp – Célula pilar; Ei – Epitélio interlamelar; Er – Epitélio respiratório; Es - lacuna ou lúmem capilar; L1 Lamela primária; Hem – Hemácias; L2 – Lamela secundária ou respiratória.

Para os peixes não desafiados com o parasita não houve quaisquer alterações nas estruturas das brânquias após os tratamentos com extrato de alho nem com o grupo controle, indicando que o uso do extrato de alho nessas concentrações (0,5, 2,5 e 5%) não altera estas estruturas. Por outro lado, nos peixes desafiados com o parasita, é possível observar grandes alterações nas brânquias, ocasionadas pelo *I. multifiliis*, em todos os tratamentos e também no grupo controle, não havendo diferenças entre os peixes que receberam as dietas com extrato de alho e o grupo controle conforme demonstrado na figura 15.

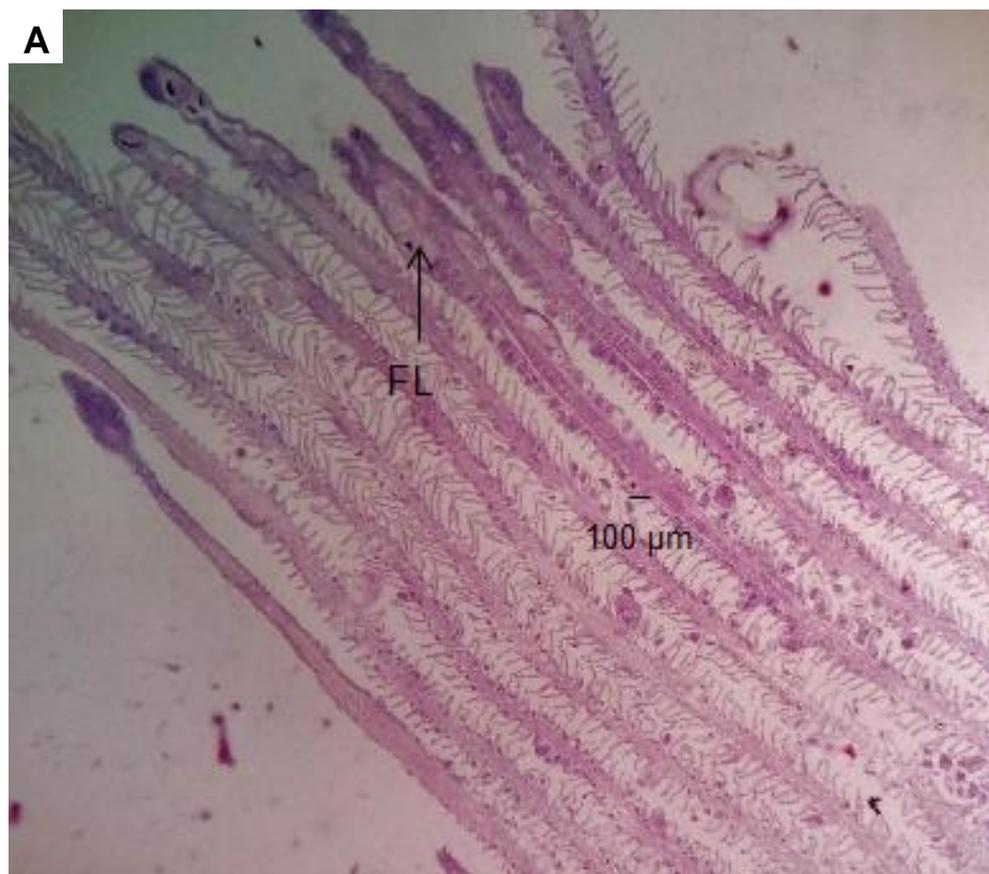
Figura 15 – Histologia representativa de Brânquia normal de peixe não desafiado com o parasita em menor (A) e maior detalhe (C e E); Histologia representativa de Brânquia de peixe desafiado com o parasita em menor (B) e maior detalhe (D e F).

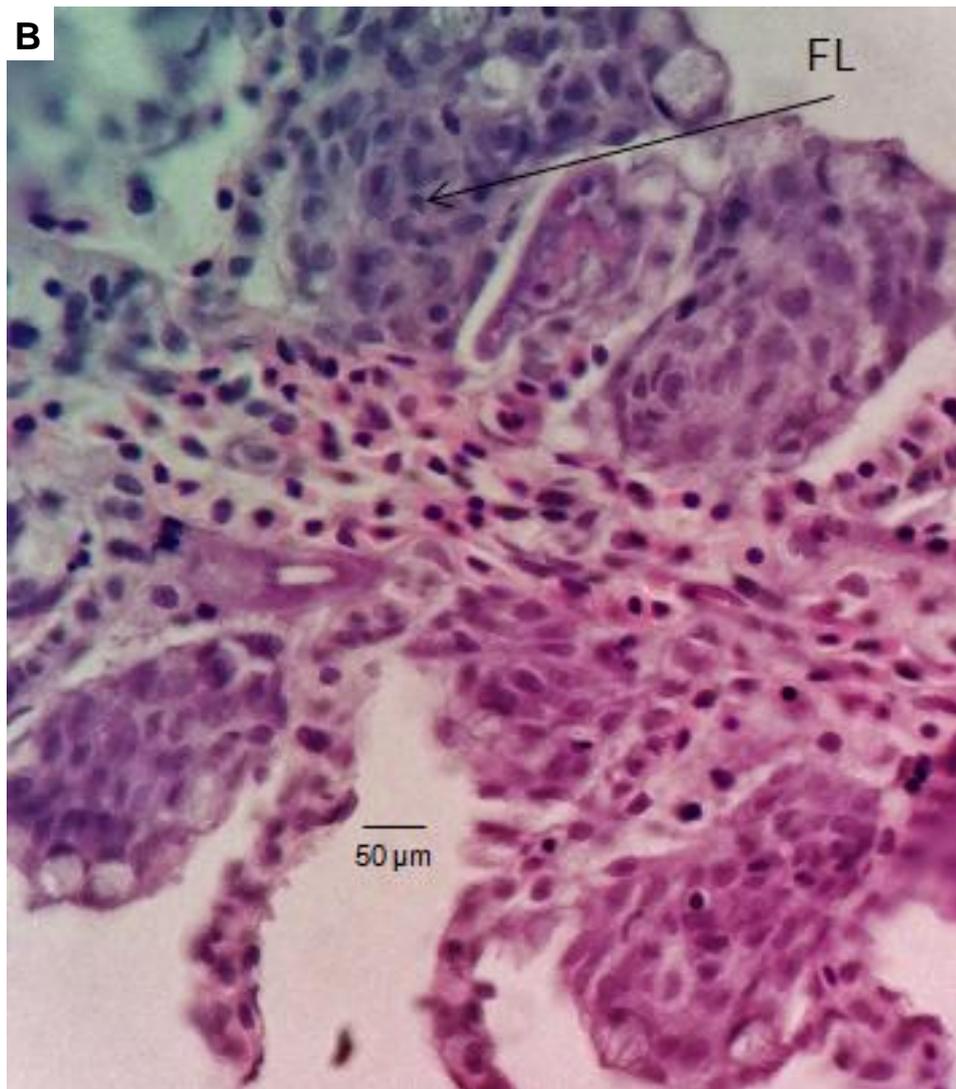


Fonte: Amorin, 2016. Legendas: LPN – Lamela Primária Normal; LPA – Lamela Primária com Alteração; LSN – Lamela Secundária Normal; LSA - Lamela Secundária com Alteração; LS – Lamela Secundária; I.m. – *I. mutifiliis*.

Nas brânquias dos peixes que não foram desafiados com o parasita não foram observadas alterações das lamelas respiratórias como desestruturação das lamelas secundárias, hipertrofia (aumento do tamanho das células), hiperplasia (aumento do número de células) ou fusão de lamelas respiratórias. Já para os peixes desafiados com o parasita é possível observar infestação do *I. multifiliis*, desestruturação das lamelas secundárias, hiperplasia e fusão de lamelas respiratórias (Figuras 15 e 16). A partir das imagens histológicas é possível sugerir que a fusão e a desestruturação das lamelas secundárias estejam aumentando a distância entre a água e o sangue, dificultando o processo de oxigenação para os peixes, um dos prováveis motivos para a grande mortalidade.

Figura 16 – Histologia representativa de brânquia de Jundiá (A) Desestruturação das lamelas secundárias; (B) Desestruturação e fusão de lamela secundária.





Fonte: Amorin, 2016. FL – Fusão de lamela.

5.3.2 Análises Histológicas do Tegumento

O tegumento dos peixes é composto por três camadas principais, a epiderme, a derme e a hipoderme, estruturas estas que estão de acordo com a descrição de Hussain (2009) (Figura 17).

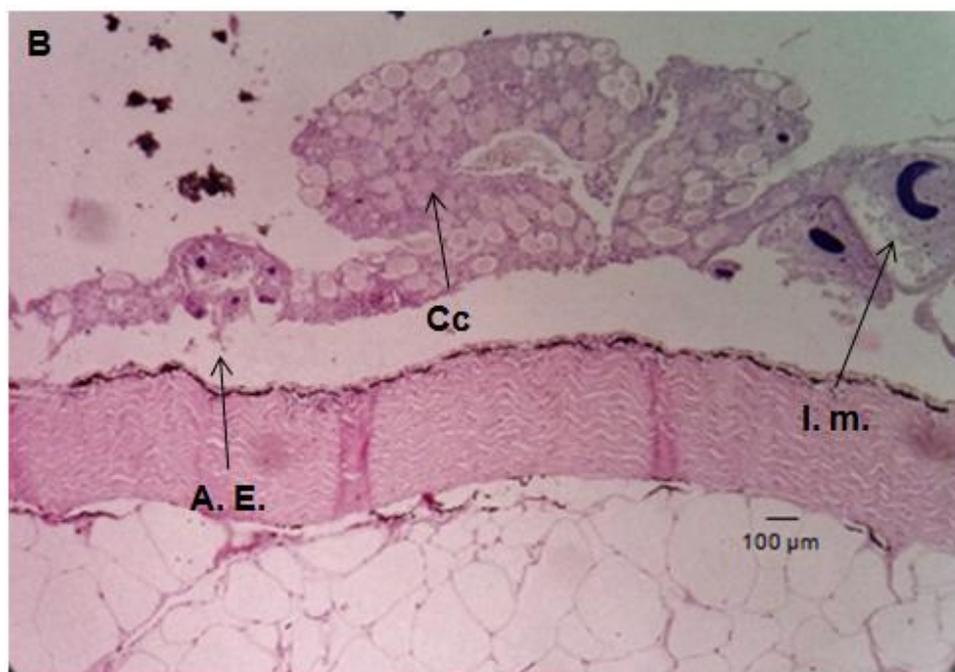
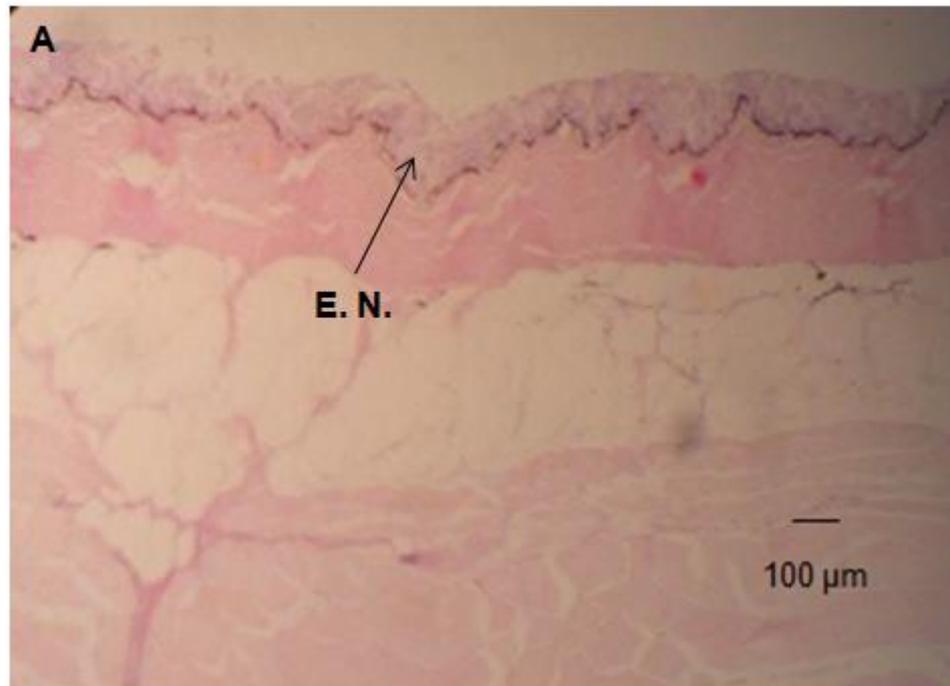
Figura 17 – Histologia normal de tegumento de *R. quelen* não desafiado com o parasita.

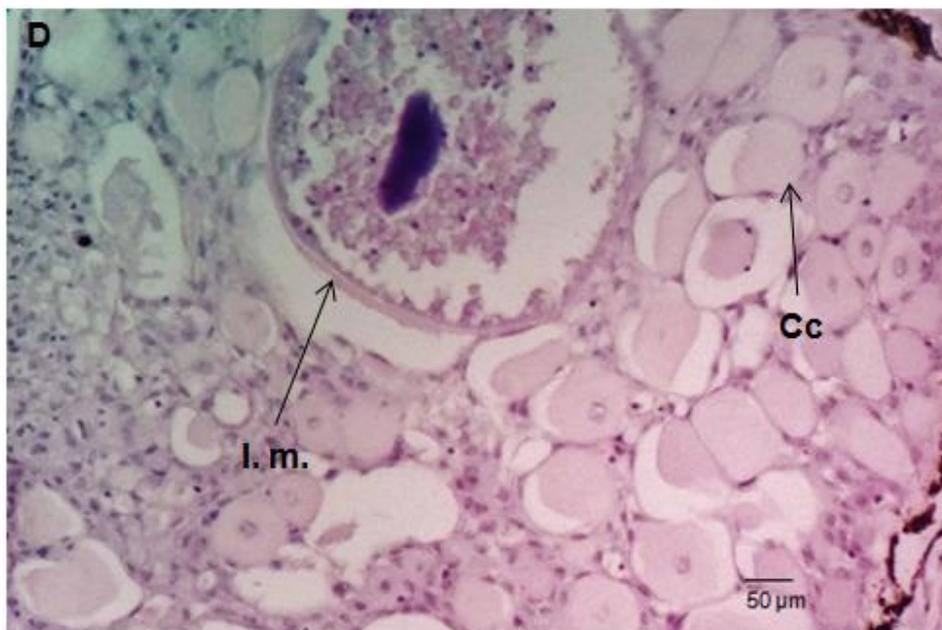
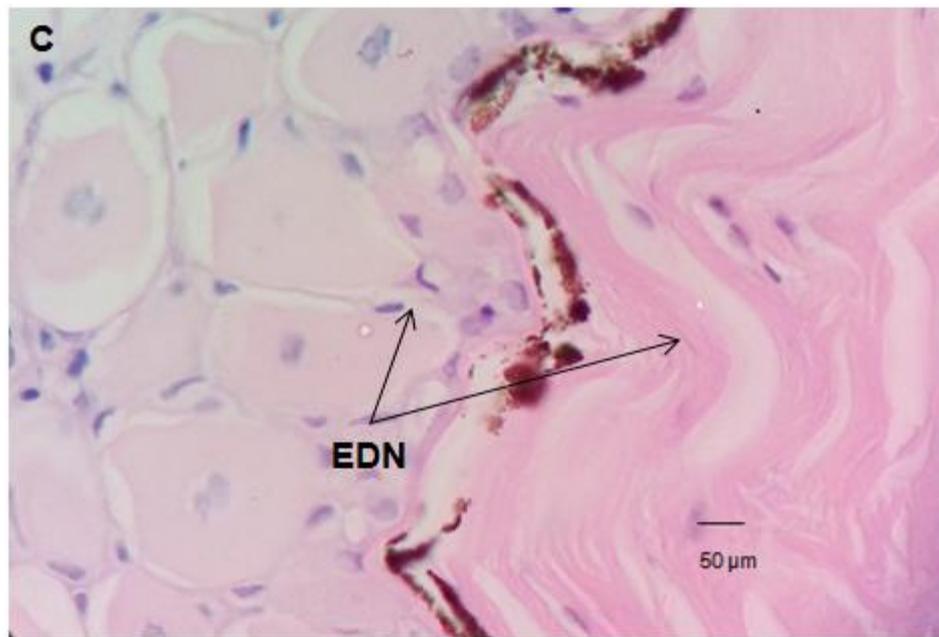


Fonte: Amorin, 2016. Legendas: Bm – membrana basal; Cc – “Club Cells”; Ce – Camada epitelial exterior; D – Derme; E – Epiderme; Fb – Fibroblastos; Ta – Tecido adiposo (hipoderme).

Na figura 18 é possível verificar a comparação dos peixes não desafiados com o parasita *Ictio* daqueles que foram desafiados com o mesmo. Nota-se que nos peixes não desafiados com o parasita não houve quaisquer alterações nas estruturas do tegumento após os tratamentos com extrato de alho nem com o grupo controle, indicando que o uso do extrato de alho nessas concentrações (0,5, 2,5 e 5%) não altera estas estruturas. Por outro lado, nos peixes desafiados com o parasita é possível observar grandes alterações no tegumento, ocasionados pelo *I. multifiliis*, em todos os tratamentos e também no grupo controle, não havendo diferenças entre os peixes que receberam as dietas com extrato de alho e o grupo controle.

Figura 18 - Histologia representativa do tegumento de Jundiá (A) Tegumento normal de peixe não desafiado com o parasita; (B) Tegumento de peixe com alteração na sua estrutura ocasionados pelo parasita *I. multifilis* e proliferação de "club cells"; (C) Epiderme e derme normal sem alterações; (D) Alteração da epiderme ocasionada pelo parasita *I. multifilis* e proliferação de "club cells".





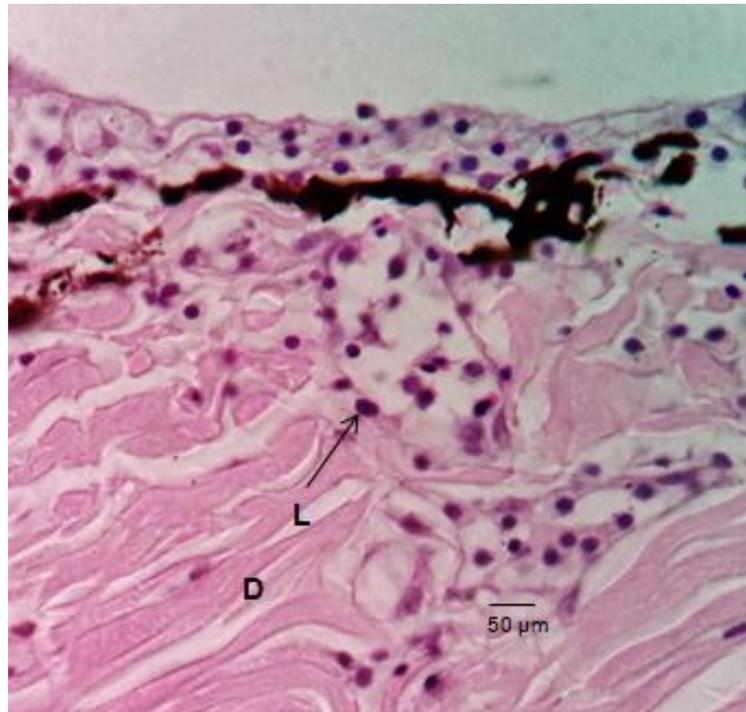
Fonte: Amorin, 2016. AE – Alteração da Epiderme; Cc – “Club cells”; EN – Epiderme Normal; EDN – Epiderme e Derme Normais; I.m. – *I. multifilis*.

Em relação aos peixes desafiados com o parasita é possível observar na figura 19 (A) que há uma reação inflamatória com a presença de leucócitos na derme. A presença dos leucócitos no tecido está diretamente relacionada ao parasitismo e indica uma tentativa de reação de defesa por parte do animal (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Na figura 19 (B) observa-se que a infestação pelo Ictio se deu apenas na epiderme do tegumento, não penetrando na derme, provavelmente pela resposta das células de defesa

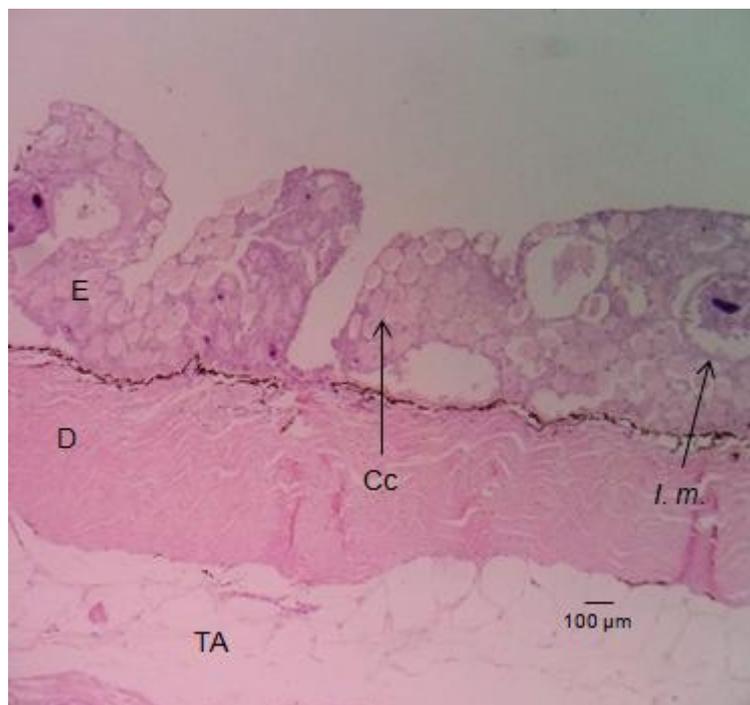
presentes sendo possível também visualizar uma grande proliferação de “club cells” na epiderme.

Figura 19 – Histologia representativa do tegumento de Jundiá (A) Migração leucocitária na derme; (B) *I. multifiliis* parasitando o tegumento (epiderme) e grande proliferação de “club cells”.

A



B



Fonte: Amorin, 2016. Cc – “Club cells”; D – Derme; E – Epiderme; I.m. – *I. multifiliis*; L – Leucócitos; TA – Tecido Adiposo.

As “club cells” são células grandes e ovoides que se encontram nas camadas superficiais da epiderme (IGER et al., 1994; CHIVERS et al., 2007). Anteriormente os pesquisadores relacionavam a função dessas células à produção de moléculas sinalizadoras e eram denominadas células de alarme a predadores. Por outro lado, estudos mais recentes afirmam que provavelmente estas células não estão associadas com a produção de substâncias indutoras de alarme, uma vez que seu conteúdo não pode ser liberado voluntariamente (CHIVERS et al, 2007) e sim sugerindo que as “club cells” fazem parte do sistema imunológico, sendo estimuladas através de diferentes agentes estressores (IGER et al. 1994; CHIVERS et al, 2007; HALBGEWACHS, 2009). Chivers et al. (2007) afirmam que a função primária das “club cells” é fornecer a primeira linha de defesa contra parasitas ou patógenos que penetram através da pele, e/ou promover a cicatrização da pele danificada. Diante disso, pode-se observar na figura 18B, 18D e 19B que houve uma grande proliferação celular e desestruturação da epiderme, com aumento do número de “club cells” para os peixes que foram desafiados com o parasita *I. multifiliis*, indicando que possivelmente estas células tem função de defesa contra parasitas, o que justificaria a sua proliferação no caso da infestação causada pelo *I. multifiliis*.

6 CONCLUSÕES

Em relação aos resultados encontrados nesse estudo pode-se concluir que:

- o uso do extrato de alho na ração não promoveu alterações significativas na glicemia, conteúdo de glicogênio hepático e atividades das aminotransferases indicando que não influencia na homeostasia metabólica basal dos animais. Por outro lado, o extrato de alho estimulou a síntese de glicogênio muscular, disponibilizando maior reserva de energia para este tecido;

- a suplementação com alho promoveu redução da atividade da catalase no fígado dos juvenis sem alterações na lipoperoxidação tecidual, indicando que o alho pode influenciar o status antioxidante dos animais dependendo da dose e do tempo de tratamento utilizado. Este é o primeiro relato sobre atividade antioxidante do alho em juvenis de jundiás;

- o extrato de alho nas concentrações e tempo utilizados não atuou como promotor de crescimento para os juvenis de jundiá;

- as alterações hematológicas observadas nos grupos suplementados com alho sugerem que concentrações mais elevadas podem comprometer a capacidade de transporte de oxigênio uma vez que as concentrações de hemoglobina e os índices hematimétricos foram reduzidos e, conseqüentemente, alterar as funções metabólicas do tecidos.

- a suplementação da dieta com extrato de alho não promoveu alterações na capacidade de resposta imune basal dos peixes, não melhorando a resistência frente à infestação com o parasita *I. multifiliis*;

- os animais infestados com o parasita não apresentaram lesões secundárias provocadas por bactérias sugerindo que o extrato de alho nas concentrações utilizadas neste estudo possam apresentar um efeito protetor contra infecções bacterianas. Para comprovar esse possível efeito em jundiás, estudos mais específicos *in vitro* e *vivo* com bactérias podem ser desenvolvidos posteriormente;

- Ainda existe poucos estudos em relação ao uso do alho na ração, em especial com o *R. quelen*, ressaltando a necessidade de mais estudos envolvendo doses, tempos de tratamento e diferentes fases de

desenvolvimento para caracterizar adequadamente os efeitos do alho no metabolismo, no sistema imune do jundiá e na sua capacidade de resposta frente à agentes patogênicos diversos como parasitas e bactérias.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GALIL, M.A.; ABOELHADID, S.M.; Trials for the control of trichodinosis isandgyro dactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. **Veterinary Parasitology**, v.185, p.57-63, 2012.
- ABREU, J.S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com b 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura**. 2007.137 f. Tese (Doutora em Aquicultura) - Curso de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALDRIN, J.F.; MESSENGER, I.L.; BAUDIN LAURENCIN, F.; La biochimie Clinique en aquaculture. Interet perspective. **Cnexo Actes Colloq**, v.14, p. 219-326, 1982.
- ALVES, S.R.C. **Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço. Joinville, SC**. 2003. 52 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.
- ALY, S.M.; MOHAMED, M.F. Echinacea purpurea and Allium sativum as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.94, p.31-39, 2010.
- ASL, A.Z.; GHASEMI, A.; AZIZI, F.; Serum nitric oxide mtebolites in subjects with metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1342-1347, 2008.
- AZZA, M.M.; RHMAN, A.E.; Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, p. 454–459, 2009.
- BAGLIOLI, B. **Vitamina c na dieta e influência nas respostas de estresse e resistência de juvenis de jundiá expostos ao ictio**. 2008. 48 f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BALDISSEROTTO, B. Biologia da espécie. In: BALDISSEROTTO, B.; NETO, J.R. **Criação de jundiá**. Santa Maria: UFSM, 2004, p. 67-72.
- BALDISSEROTTO, B.; NETO, J.R.; BARCELLOS, L.G.; Jundiá (*Rhamdia* sp.). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C.; **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2.ed. Santa Maria: UFSM, 2010, p. 317- 321.
- BALDISSEROTTO, B. Crescimento. In: BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada a piscicultura**. 3. ed. Santa Maria: UFSM, 2013. p. 152-321.

- BALFRY, S.K.; IWAMA, G.K.; Observations on the inherent variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 138, p. 207-211, 2004.
- BARCELLOS, L.J.G.; WOEHL, V.M.; WARSEMANN, G.F.; QUEVEDO, R.M.; ITTZE, I.; KRIEGER, M.H. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoi & Gaimard), a South American Catfish. **Revista Aquicultura**, v.32, p.121-123, 2001.
- BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA S.M.G.; WOEHL, V.M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências (Revisão). **Boletim Instituto de Pesca**, v. 26 n.1p. 99-111, 2000.
- BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; SOUZA, C.; RODRIGUES, L.B. FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, v. 237, p. 229-236, 2004.
- BARD, J.J.; BOSCOLO, W.R.; MALUF, M.L. F.; FEIDEN, A.; REIDEL, A.; MAHL, I.; SIGNOR, A.A. Análise Hematológica de Alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen*) Submetidos a Dieta Alimentar com Diferentes Níveis de Inclusão de Alho (*Allium sativum*). In: I Simpósio Nacional de Engenharia de Pesca e III Simpósio Paranaense de Engenharia de Pesca. 2006. Toledo, PR. **Anais do (...)**. Toledo, Paraná: UNIOESTE, 2006, p. 6.
- BAUMGARTNER, G.; PAVANELLI, C.S.; BAUMGARTNER, D.; BIFI, G.A.; DEBONA, T.; FRANA, V.A. **Peixes do baixo rio Iguçu**. Maringá: Ed. UEM, 2012, p. 1-14.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. v.1. Rio de Janeiro: S.A., 1976.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D.; URBINATI, E.C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86 n. 3, p. 1483-1495, 2014.
- BOCKMANN, F.; GUAZZELLI, A.Y.G.M. Family Heptapteridae. In: R.E. REIS; S.O. KULLANDER & C.J. FERRARIS JR (Eds). **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Ed. Pucrs, 2003, p. 729.
- BORBA, M.R.; MACHADO, F.D.; FREITAS A. F. Efeito da suplementação de vitamina C na dieta sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*, ao *Ichthyophthirius multifiliis*. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 29, p. 93-99, 2007.
- BORGES, A. **Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses subletais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmem do Jundiá *Rhamdia quelen***. 2005. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BOYD, C.E. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. **Aquaculture**, v. 226, p. 101-112, 2003.

BRANDÃO, D.A. Profilaxia e Doenças. In: BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R.; **Criação de jundiá**. Santa Maria: UFSM, 2004, p. 161-189.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Instrução Normativa Interministerial MAPA/MPA nº 28/2011. Disponível em: <<http://www.normaslegais.com.br/legislacao.htm>>. Acesso em: 7 jul. 2015.

BRAUN, N.; LIMA, R. L.; MORAES, B.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. **Aquaculture Research**, v.37, p.1524-1531, 2006.

BUCHMANN, K.; JENSEN, P.B.; KRUSE, K.D. Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: in vitro experiments. **North American Journal of Aquaculture**, v. 65, p. 21-24, 2003.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid Peroxidation. In: FLESICHER, S., PACKER, L. (Eds.), **Methods in Enzymology**. v. 52. p. 302–310, 1978.

CAMARGO, S.O.; POUHEY, J.L.; MARTINS, C. Parâmetros eritrocitários do jundiá (*Rhamdia quelen*) submetido à dieta com diferentes níveis de proteína. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1406-1411, 2005.

CARVALHO, O.M. O Oligopólio na Produção de Sementes e a Tendência à Padronização da Dieta Alimentar Mundial. In: STEDILE, J.P.; ESTEVAM, D.; **A Questão Agrária no Brasil o Debate da década 2000**. São Paulo: Expressão Popular, 2013, p. 39-56.

CHAGAS, F.C.; ZANETTI, J.F.; OLIVEIRA, V.A.C.; DONATINI, R.S. *Allium sativum* na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 7, n. 2, p. 1-11, 2012.

CHARJAN, A.P.; KULKARNI, K. M. Effects of dietary garlic on growth performance in the fresh water fish *Channa orientalis* (Sch.). **International Journal of Theoretical & Applied Sciences**, v. 5, p. 121–124, 2013.

CHITMANAT, C.; TONGDONMUAN, K.; NUNSONG, W. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* spp. In: Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 359-364, 2005.

CHIVERS, D.P.; WISENDEN, B.D.; HINDMAN, C.J.; MICHALAK, T.A.; KUSCH, R.C.; KAMINSKYJ, S.G.W.; JACK, K.L.; FERRARI, M.C.O.; POLLOCK, R.J.; HALBGEWACHS, C.F. POLLOCK, M.S.; ALEMADI, S.; JAMES, C.T.; SAVALOJA, R.K.; GOATER, C.P.; CORWIN, A.; MIRZA, R.S.; KIESECKER,

J.M.; BROWN, G.E.; ADRIAN, J.C.; KRONE, P.H. BLAUSTEIN, A.R.; MATHIS, A. Epidermal 'alarm substance' cells of fishes maintained by nonalarm functions: possible defence against pathogens, parasites and UVB radiation. **Biological Sciences**, v. 10, p. 1-13, 2007.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D.; LAZZARI, R.; DUARTE, M.F.; MORSCH, V.M.; PIPPI, A.L.; VIEIRA, V.P. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.65, p.48-55, 2006.

DE SILVA, S.S.; ANDERSON, T.A. **Fish Nutrition in Aquaculture**. London: Chapman and Hall, 1995, 319 p.

DELGADO, G.C. **Do Capital Financeiro na Agricultura à Economia do Agronegócio**. Porto Alegre: UFRGS, 2008, 144 p.

DIAB A.S.; EL-NAGAR, G.O.; ABD-EL-HADY, Y. M. Evaluation of *Nigella sativa* L(black seeds; baraka), *Allium sativum*(garlic) and BIOGEN as feed additives on growth performance and immunostimulants of *O. niloticus* fingerlings. **Suez Canal Veterinary Medicine Journal**, p. 745-775, 2002.

DIAB, A.S.; ALY, S.M.; JOHN, G.; ABDE-HADI, Y.; MOHAMMED, M.F. Effect of garlic, black seed and Biogen as immunostimulants on the growth and survival of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae), and their response to artificial infection with *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Aquatic Science**, v. 33, n. 1, p. 63-68, 2008.

DÍAZ GONZÁLEZ, F.H.; SILVA, S.C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 2006, 364 p.

DOTTA, G.; **Efeito imunomodulador dos extratos de própolis e Aloebarbadensis, suplementados na dieta de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***. 2013. 124 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

EIRAS, J.C; TAKEMOTO, R.M; PAVANELLI, G.C. **Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Clichetec, 2010, 333 p.

ELLIS, A.E.; Lysozyme assays. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERSON, B.S.; MUISWINKEL, W.B.; **Techniques in Fish Immunology**. p. 101-103, 1990.

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma, 2014.

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma, 2016.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative

stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415-430, 2007,

FIGUEREDO, A.B. **Aspectos sanitários do Jundiá (*Rhamdia quelen*) na região litoral do centro do estado de Santa Catarina, Brasil**. 2013. 88 f. Dissertação (Mestre em Aquicultura) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

FONSECA, S.M.D.; RODRIGUES, M.I.; MARRONI, N.P.; PORAWSKI M. Determinação da Lipoperoxidação e Atividade da Catalase em Fígado e Brânquias de Peixes Coletados no Arroio Sapucaia, Bacia Do Guaíba, RS. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n.1, p. 79-87, 2002.

GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdiaspp.*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. Santa Maria – RS. 1980. 99 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1980.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproductibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39. 1971.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A.R.C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 30, p. 179-185, 2000.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, v.1, p. 851, 2007.

HALBGEWACHS, C.F.; MARCHANT, T.A.; KUSCH, R.C.; CHIVERS, D.P. Epidermal club cells and the innate immune system of minnows. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 98, p. 891-897, 2009.

HEINERMAN, J. The healing benefits of garlic. **Nutrition**, v.13, p.173-174, 1999.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. Impacto das Atividades de Aquicultura e Sistemas de Tratamento de Efluentes com Macrófitas Aquáticas – Relato De Caso. **Boletim Instituto de Pesca**, v. 34, p. 163 - 173, 2008.

HOROBIN, R.W.; BANCROFT, J.D. **Troubleshooting histology stains**. Hong Kong: Ed. Pearson Professional Limited. 1998, p. 266.

HUSSAIN A. M.D.; RANA. A.A.; GAZWA, D.A. Histological Structure of the integument in *Mystus pelusius* (Solander). **Journal of Madent Alelem College**, v. 1, p. 1-17, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal. Brasil**, v.43, 2015.

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

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The fish Immune System. **Fish Physiology**, v. 15, p. 311-337, 1996.

IWASHITA, M.K.P.; MACIEL, P.O. Princípios básicos de sanidade de peixes. In: EMBRAPA. **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília, Distrito Federal: Embrapa, 2013. 440 p.

KEMPER, K.J. **Garlic (*Allium sativum*)**. 2000. Long wood HerbalTask Force. Disponível em: < <http://www.longwoodherbal.org/garlic/garlic.pdf>> Acesso em: 1 julho 2015.

KLINGER, C.; HUET, J.; SONG, D.; PETERSEN, G.; RIVA, M.; BAUTZ, E.K.; SENTENAC, A.; OUDET, P.; SCHULTZ, P. Localization of yeast RNA polymerase I core subunits by immunoelectron microscopy. **EMBO**, v. 15, p. 4643-4653, 1996.

KRISMAN, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical Biochemistry**. v. 4, p.17-23, 1962.

KUBITZA, F. Sistemas de Recirculação: Sistemas fechados com tratamento e reuso da água. **Panorama da Aquicultura**, v. 16, p.15-22, 2006.

LACKNER, R. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T. HINTON, D. E. STREIT, B. **Fish ecotoxicology**. Basileia, Suíça: Birkhäuser, p. 203-224, 1998.

LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; CORRÊIA, V.; ROSSATO, S.; FERREIRA C.C.; SUTILI, F.J.; DUARTE, M.M.M.F. Hematologia de jundiás em resposta ao nível de proteína na dieta. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, p. 192-197, 2011.

LEE, D.H.; RA, C.S.; SONG, Y.H.; SUNG, K.I.; KIM, J.D. Effects of dietary garlic extract on growth, feed utilization and whole body composition of juvenile starlet sturgeon (*Acipenserruthenus*). **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**. v. 25, p. 577-583, 2012.

LEE, J.Y.; GAO, Y. Review of the Application of Garlic, *Allium sativum*, in Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, p. 447-458, 2012.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.C.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 5ª ed. São Paulo: Artmed, 2011. 1274 p.

LI, C.; XU, Q.Y.; XU, H.; ZHANG, T.Q. Effects of different feed additives on immunity and antioxidation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). **Journal of Anhui Agricultural University**. v. 35 p. 456–461, 2008.

LI Z. H.; ZLABEK V.; VELISEK J.; GRABIC R.; MACHOVA J.; RANDAK T. Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, p. 137–141, 2010.

LIMA, A.F.; BERGAMIN, G.T.; MORO, G.V. Engorda de peixes. In: EMBRAPA. **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 440 p.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulates reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 656-666, 2001.

LOPES, R.B.; CECARELLI, P.S.; TORNISIELO, V.L. **Insumos químicos na piscicultura paulista**. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/89/INSUMOSQuimicosPisciculturaPaulista89.asp>> Acesso em: 5 out. 2016.

LUO, Q.H.; HE, J.H.; LIU, Q.B.; LI, M. N. Effect of *Eucommia ulmoides* and garlic preparations on performance and flesh quality of Grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. **Water Conservancy Related Fisheries**, v. 28, p. 69–71, 2008.

JOHN, G.; MESALHY, S.; REZK, M.; EL-NAGGAR, G.; FATHI, M. Effect of some immunostimulants as feed additives on the survival and growth performance of Niletilapia, *Oreochromis niloticus* and their response to artificial infection. **Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries**, v. 11, p. 1299-1308, 2007.

MACHADO, M.R.; FANTA, E. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 361-372, 2003.

MALHEIROS, S.V.P. Integração Metabólica nos Períodos Pós-Prandial e de Jejum. **Revista Brasileira de ensino de Bioquímica e Biologia molecular**, n. 1, p. 1-7, 2006,

MARCHIORI, V.F. **Propriedades funcionais do alho (*Allium sativum* L.)**. Disponível em <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/alho_revisado.pdf> Acesso em: 29 julho, 2015.

MARCHIORO, M.I. **Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy&Gaimard, 1824, Pisces, Pimelodidae) à variação de pH e salinidade da água de cultivo**. Santa Maria, RS, 1997. 87 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1997.

- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MIYAZAKI, D.M.Y.; BRUM, C.D.; ONAKA, E.M.; FENERICK Jr. J.; BOZZO, F.R. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) infection in cultivated pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and its haemathological effects. **Parasite**, v. 9, p. 175-180, 2002.
- MCELROY, A.E.; HICE, L.A.; FRISK, M.G.; PURCELL, S.L.; PHILLIPS, N.C.; FAST, M.D. Spatial patterns in markers of contaminant exposure, glucose and glycogen metabolism, and immunological response in juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 14, p. 1-13, 2015.
- METWALLY, M.A.A. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in *Tilapia Nilotica* (*Oreochromis niloticus*). **World Journal of Fish and Marine Sciences** v.1, p. 56–64, 2009.
- MILITZ, T.A.; SOUTHGATE, P.C.; CARTON, A.G.; HUTSON, K.S. Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. **Journal of Fish Diseases**, v. 37, p. 451-61, 2014.
- MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **Nitric oxide: Biology and Chemistry**, v. 5, p. 62–71, 2001.
- MOHEBBI, A.; NEMATOLLAHI, A.; DORCHEH, E.E.; ASAD, F.G. Influence of dietary garlic (*Allium sativum*) on the antioxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Research**, v. 43, p. 1184-1193, 2011.
- MONTEIRO, M.M.O.; PACHÚ, C.O.; DANTAS, I.C. *Allium sativum* como agente terapêutico para diversas patologias: uma revisão. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 2, p. 01-06, 2008.
- MOON, T.W.; FOSTER, G.D. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: Hochachka, T.P. **Metabolic Biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1995, p. 65-100.
- MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J.R.; JASEN, P.L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 892-896, 1995.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Primeiro Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica BRASIL**. 1998. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/acessibilidade/item/7926-primeiro-relat%C3%B3rio>> Acesso em: 20 jul 2015.
- MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 2011**. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf> Acesso em: 21 Jul 2015.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **1º Anuário de Pesca e Aquicultura. MPA, 2014.** Disponível em: <
http://issuu.com/revistas_nd/docs/anu_rio_pesca_e_aquicultura_2014_i/1> Acesso em: 13 de jul de 2015.

MUNIRUZZAMAN, M.; CHOWDHURY, M.B.R. Evaluation of medicinal plants through fish feed against bacterial fish disease. **Progress in Agriculture**, v.19, p.151-159, 2008.

NAKANO T.; KANMURI T.; SATO M.; TAKEUCHI M. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1426, p. 119–125, 1999.

NATHAN, C.F.; HIBBS, J.B. Role of nitric oxide synthases in macrophage antimicrobial activity. **Current Opinion in Immunology**, v.3, p.65-70, 1991.

NDONG, D.; FALL, J. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). **Document Scientifique du CRODT**, v. 13, p. 1-22, 2007.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian Thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287–1312, 2001.

OLIVEIRA, A.P.G.; OLIVEIRA, A.F.M.; VIEIRA, B.C.R.; SOUZA, M.H.; AMARAL, A.A. Alho (*Allium sativum* Linn.) como fitoterápico para animais de produção. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, p. 46-61, 2015.

ONAKA, E.M.; MORAES, F.R. Enfermidades parasitárias de peixes. **Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuicultura**. v. 1, p. 1-22, 2004.

PÁDUA, S.B.; MENEZES FILHO, R.N.; DIAS NETO, J.; JERÔNIMO, G.T.; ISHIKAWA, M.M.; MARTINS, M.L. 2013. **Ictiofitiríase: conhecendo a doença para elaborar estratégias de controle.** Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/novosite/?p=2120>> Acesso em: 25 jul 2015.

PAULSEN, S.M.; LUNDE, H.; ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. *In vivo* effects of β -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.14, p. 39-54, 2003.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doença de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento.** 3ª ed. Maringá: UEM, 2008.

PELIELO, J.C. A ação dos radicais livres e o processo fisiológico de envelhecimento. **Revista Eletrônica**. n. 12, p. 1-3, 2011.

PIAIA, R.; TOWNSEND, C.R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. **Aquaculture International**, v. 7, p. 201-205, 1999.

R. **Development Core Team R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>> 2011.

RANZINI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos.** São Paulo: Varela, 2004, p. 89-120.

RANZINI-PAIVA, M.J.T.; ROMAGOSA, E.; ISHIKAWA, C.M. Hematological parameters of “cachara” *Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1768 (Osteichthyes, Pimelodidae) reared in captivity. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.31, p. 47-53, 2005.

RAW, I. Mecanismo de ação da insulina. **Revista de Medicina**, v. 85, n. 4, p. 124-129, 2006.

RIBEIRO, P.A.P.; COSTA, L.S.; ROSA, P.V. Manejo alimentar em piscicultura convencional. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.7, p.1189- 1196, 2010.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memorial Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-35, 1947.

SANTOS, F.C.C.; VOGEL, F.S.F.; MONTEIRO, S.G. Efeito do suco de alho (*Allium sativum* L.) sobre endoparasitas gastrintestinais de ovinos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, p. 176-181, 2011.

SANTOS, E.L.; LUDKE, M.C.M.M.; LIMA, M.R. Extratos vegetais como aditivos em rações para peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, p. 789-800, 2009.

SECOMBES, C.J.; WANG, T.; HOG, S.; PEDDIE, S.; CRAMPE, M.; LAING, K.J.; CUNNINGHAM, C.; ZOU, J. Cytokines and innate immunity of fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, p. 713-23, 2001.

SCHALCH, S.H.C. **A Necessidade da Regulamentação de Produtos Químicos Utilizados na Aquicultura Brasileira.** Disponível <www.pesca.sp.gov.br>. Acesso em 18 out. 2016.

SCHELKLE, B.; SNELLGROVE, D.; CABLE, J. In vitro and in vivo efficacy of garlic compounds against *Gyrodactylus turnbulli* infecting the guppy (*Poecilia reticulata*). **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 96-101, 2013.

SEIXAS FILHO, J.T. Uma revisão sobre o papel do carboidrato e da proteína no metabolismo de peixes com hábitos alimentar carnívoro e onívoro. **Revista Augustus**, v. 09, p. 32-51, 2004.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J. BURNS, V. ALVES JÚNIOR, A. J.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **Revista Agroindústria - BNDES Setorial**, v. 35, p. 421 – 463, 2012.

SHALABY, A.M.; KHATTAB, Y.A.; ABDEL RAHMAN A.M. Effects of Garlic (*Allium Sativum*) and Chloramphenicol on Growth Performance, Physiological Parameters and Survival of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, p.172-201, 2006.

SHEPHARD, K.L. Functions for fish mucus. **Review in fish biology and fisheries**. v. 4, p. 401-429, 1994.

SILVEIRA, U.S.; LOGATO, R.P.V.; PONTES E.C. Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, n. 1, p.817-836, 2009.

SOUSA, P.N.R. **Parâmetros bioquímicos e enzimáticos para jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados em alta e baixa frequência com diferentes níveis de proteína**. Botucatu, SP, 2012, 58 f. Dissertação (mestrado em Zootecnia), Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2012.

SOUZA, V.N.; MARTINS, M.L.; DE MORAES, F.R.; KRONKA, S.N. Metodologia de infecção experimental e grau de susceptibilidade do híbrido “tambacu” e *Leporinus macrocephalus* Garavello e Britski (*Osteichthyes, Anostomidae*) a quatro inóculos de trofozoítos de *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet (*Protozoa, Ciliophora*). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, p. 803-811, 2001.

TALPUR, A.D.; IKHWANUDDIN, M. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). **Aquaculture**, v. 364-365, p. 6-12, 2012.

TANAKA R.; HIGO Y.; SHIBATA T.; SUZUKI N.; HATATE H.; NAGAYAMA K.; NAKAMURA T. Accumulation of hydroxy lipids in live fish infected with fish diseases. **Aquaculture**, n.211, p. 341–351, 2002.

TANCREDO K.R. **Imunização com *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) em jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy& Gaimard, 1824): efeitos na sobrevivência, respostas hemato-imunológicas, bioquímicas e histopatológica**. 2015. 85 f. Dissertação (Mestre em Aquicultura. Universidade do Estado de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, 2015.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil I Protozoários. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, p. 67-79, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: El autor, 2004, 144 p.

TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M.M.; MARTINS, M.L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S.B; JERÔNIMO, G.T.; SÁ, A.R.S. **Tópicos especiais em saúde e produção animal**, São Carlos: Pedro e João Editores, 2009, p. 43-80.

TAVECHIO, W.L.G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a Prevenção e o Controle de Patógenos em Piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 2, p. 335 - 341, 2010.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Rocca, 2002, p. 223-246.

TOMAZ, P.K.; CAMPOS, C.M. Adição de alho em pó na ração para controle parasitário em *Pseudoplatystoma reticulatum*. Anais do 10º ENIC – **Ciências Agrárias**. n. 4, 2012.

TORT, L.; BALASCH, J.C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Inmunología**, v. 22, p. 277-286, 2003.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p. 171-193, 2004.

VALLADÃO, G.M.R. **Potencial de Óleos Essenciais de Plantas para Tratamento de Enfermidade em Peixes**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestre em Aquicultura) - Centro De Aquicultura da Unesp – CAUNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

VALENTE, C.; ABOUA, G.; PLESSIS, S.S.D. Garlic and Its Effects on Health with Special Reference to the Reproductive System. In: Oguntibeju, O. (Ed) **Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health**. Ed. InTech, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/57191>> Acesso em: 06 julho 2015.

VARGAS, R.J.; SOUZA, S.M.G.; MABILIA, R.G.; CARLET, F.; BAGGIO, S.R. Resposta Fisiológica à Infestação Experimental com *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) em Alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy E Gaimard, 1824) Previamente Alimentados com Diferentes Fontes Lipídicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, p. 81-86, 2008.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. The effect of vitamin C on fish health. **Brochure Roche Vitamins**, p. 1-30, 1997.

VILLAMIL, L.; TAFALLA, C.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Evaluation of Immunomodulatory Effects of Lactic Acid Bacteria in Turbot (*Scophthalmus maximus*). **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 1318–1323, 2002.

VILÉLA, M.B.F.A. **Estresse Oxidativo em Prochilodus Lineatus Expostos ao Chumbo**. 2007. 59 f. Monografia (Bacharel em ciências Biológicas), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

VINATEA, L.A. **Qualidade Da Água Em Aquicultura: Princípios E Práticas**. 3ª ed. Florianópolis: ED. da UFSC, 2010, 237 p.

XIANG, X.; LIU, C.Z. Effect of allicin on growth of *Colossoma barchipomum*. **Fisheries Science and Technology Information**. v. 29, p. 222–225, 2002.

XU, D.H.; PRIDGEON, J.W.; KLESIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A. Parasitism by protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* enhanced invasion of *Aeromonas hydrophila* in tissues of channel catfish. **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 101-107, 2012.

WEDEMEYER, G. A. Physiology of fish in intensive culture systems. **Chapman & Hall**. v. 2, p. 10-59, 1996.