UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RICARDO HENRIQUE FRANCO DE OLIVEIRA

**Efeito do maracujá (*Passiflora incarnata*) sobre a
morfometria de hepatócitos da tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*).**

RICARDO HENRIQUE FRANCO DE OLIVEIRA

**Efeito do maracujá (*Passiflora incarnata*) sobre a
morfometria de hepatócitos da tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*).**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do Título
de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Elyara Maria
Pereira da Silva

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

O483e

Oliveira, Ricardo Henrique Franco de

Efeito do maracujá (*Passiflora incarnata*) sobre a morfometria de hepatócitos da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). /

Ricardo Henrique Franco de Oliveira – Pirassununga, 2008.

59 f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.

Departamento de Ciências Básicas.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Profa. Dra. Elyara Maria Pereira da Silva

Unitermos: 1. Hepatócito 2. Histologia 3. Metabolismo intermediário 4. *Oreochromis niloticus* 5. *Passiflora incarnata*.
I. Título.

Dedicatória

Dedico à minha esposa Rute Nunes Góes Franco de Oliveira pela dedicação, amor e paciência durante a elaboração deste trabalho e também por todos os nossos dias vividos. Amo você.

Agradecimento especial

À Profa. Dra. Elyara Maria Pereira da Silva, na orientação deste trabalho e também por sua amizade, dedicação e carinho. Obrigado por fazer parte desta etapa importante de minha vida profissional e pessoal.

Agradecimentos

A Deus por tudo que és em minha vida.

À chefia do Departamento de Ciências Básicas ZAB/USP pela confiança e dispensa para realização deste estudo.

À Profa. Dra. Célia Regina Orlandelli Carrer, por sua amizade, incentivo e crédito em minha capacidade.

Aos docentes e colegas do curso de pós-graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP, pelos ensinamentos compartilhados.

A toda a equipe da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP, pelo auxílio dispensado.

Aos todos os meus colegas do Centro Educacional Anhanguera S/A – UNIFIAN Pirassununga.

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão por ceder o laboratório de Fisiologia Animal para a realização das análises fisiológicas.

Ao Prof. Dr. Júlio César Balieiro pela orientação durante as análises estatísticas.

À Profa. Dra. Mariza Pires de Melo pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Francisco J. Hernandez Blazques, pela ajuda na interpretação das lâminas histológicas.

À Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura do Laboratório de Bioprocessos da FZEA/USP, e em especial ao Técnico Guilherme de Sousa Silva.

Ao Grupo Centroflora de Botucatu, pela doação do extrato de maracujá (*Passiflora incarnata* L.).

Ao Sr. Rogério Ganéo da Estância Santa Cândida – Santa Cruz da Conceição – SP. pela doação dos exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

À Msc. Sandra A. de Oliveira no auxílio das análises laboratoriais e interpretação dos dados.

Ao Msc. Nilton Pedro dos Santos pela sua amizade e disponibilidade dos equipamentos e ensinamentos técnicos na preparação das lâminas histológicas.

À Msc. Adriana A. Cuel Barone pela amizade e disponibilidade na elaboração e compartilhamento deste experimento.

A todos os funcionários do departamento de Ciências Básicas pela ajuda, incentivo e paciência.

Aos amigos que conquistei no Departamento de Ciências Básicas em especial a Rosângela Savi Meirelles, Nathalia Thays Frasse Malaman e Rafael Gobesso.

A todos os funcionários da Biblioteca da FZEA/ USP.

Aos amigos do CEPTA-IBAMA e em especial aos pesquisadores Maria Angélica Rosa Ribeiro, Paulo S. Cicarelli e Osmar A. Cantelmo, pelos conhecimentos compartilhados.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema geral dos principais elementos que participam da resposta ao estresse nos peixes teleósteos. ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), MSH (hormônio estimulador do melanóforo) β END (beta-endorfina). Adaptado de Sjoerd e Wendelaar-Bonga (1997)02
- Figura 2 Tanque para aclimação dos peixes 10
- Figura 3 Vista geral das unidades experimentais (esquerda) e animal durante aclimação (direita) 11
- Figura 4 Coleta de sangue por punção da veia caudal 14
- Figura 5 Microscópio óptico utilizado para obtenção das imagens digitais 16
- Figura 6 Detalhe da tela do programa utilizado para morfometria e contagem das células..... 17
- Figura 7 Imagens histológicas (aumento 400 x) do tecido hepático de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos a tratamento (28 dias) com freqüentes doses de extrato seco de maracujá (*Passiflora incarnata*), veiculado na dieta. À esquerda coloração em PAS evidenciando o acúmulo de glicogênio, confirmado pela prova da amilase, à direita. Observar, à esquerda, a intensificação da coloração em função do aumento das doses do extrato (0 a 100 mg/Kg).....24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Dados da biometria e do consumo alimentar de juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratados com extrato seco de maracujá (*Passiflora incarnata*) veiculado na dieta nas doses 0, 50, 100 e 200 mg/Kg biomassa, durante 28 dias 18
- Tabela 2 Níveis de cortisol plasmático (µg/dL) e glicose (mg/dL) de juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratados com extrato seco de maracujá (*Passiflora incarnata*) veiculado na dieta nas doses 0, 50, 100 e 200 mg/Kg biomassa, durante 28 dias. Dados obtidos após exposição à própria imagem refletida em espelho durante 30 minutos 20
- Tabela 3 Contagem de células (n=290 campos) e morfometria (n= 2.900 células) dos hepatócitos de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratados durante 28 dias com extrato seco de maracujá (*Passiflora incarnata*) veiculado na dieta nas doses 0, 50, 100 e 200 mg/Kg biomassa. Morfometria expressa em µm². 22

RESUMO

OLIVEIRA, R.H.F. **Efeito do maracujá (*Passiflora incarnata*) sobre a morfometria de hepatócitos da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2008. 59 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2008.

Avaliaram-se os efeitos da administração do extrato seco de maracujá (*Passiflora incarnata*), veiculado na dieta, sobre a morfologia dos hepatócitos de juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Peixes isolados ($86,50 \pm 10,17$ g) receberam durante 28 dias ração comercial extrusada (32% PB – 2% biomassa) contendo o extrato diluído em alginato de sódio nas doses 0 (controle), 50, 100 e 200 mg/Kg, ($n = 6$ peixes/tratamento), registrando-se diariamente o consumo. No início e ao final do experimento cada indivíduo foi exposto (30 minutos) à reflexão da própria imagem em espelho (presença virtual de um coespecífico - estresse social), sendo a seguir anestesiado (2-fenoxietanol 0,5 mL/L) para realização de biometria e coleta de sangue (veia caudal) para determinação dos níveis plasmáticos de glicose e cortisol. Após 28 dias todos os animais foram sacrificados para remoção do fígado e obtenção de fragmentos utilizados na contagem de células e avaliação da morfometria do citoplasma dos hepatócitos (H/E), observando-se também as reservas de glicogênio hepático (PAS). Visando a comparação dos efeitos do estresse social natural com aquele empregado no experimento, seis peixes provenientes de um grupo de 30 indivíduos foram também sacrificados e utilizados como referência (valores basais) para avaliação dos parâmetros histológicos. Os dados foram submetidos a ANOVA, utilizando-se o proc mixed SAS 8.0 ($p < 0,05$) para os parâmetros consumo de alimento, ganho em peso e bioquímica sanguínea (cortisol e glicose) e GLM SAS 8.0 ($p < 0,01$) para a contagem de células e morfometria dos hepatócitos. Verificou-se que os pesos e os comprimentos iniciais não diferiram, que o consumo de alimento não foi alterado pela adição do extrato e que todos os peixes, independentemente do tratamento, cresceram significativamente. Os níveis de cortisol e de glicose também não diferiram inicialmente entre os grupos e não foram alterados pela presença do agente ou pela adição do extrato. Porém, observou-se um aumento significativo da glicose e redução dos níveis de cortisol em todos os peixes. A adição do extrato nas diferentes doses provocou aumento crescente e significativo da área citoplasmática e redução do número de células em todos os animais, com destaque para a dose 100 mg/Kg. O mesmo não ocorreu nos peixes do grupo controle, cujas áreas citoplasmáticas foram significativamente menores, em decorrência de um menor acúmulo de glicogênio hepático. Embora os efeitos do agente estressor empregado não tenham sido detectados pela análise dos parâmetros bioquímicos sanguíneos, verificou-se que este procedimento provocou alterações metabólicas que contribuíram para a depleção dos estoques de glicogênio no fígado. Este efeito parece ter sido revertido nos peixes que receberam a dieta contendo o extrato de maracujá que, por meio de mecanismos não elucidados neste trabalho, contribuiu para a manutenção ou aumento dos estoques de glicogênio hepático. Concluiu-se que o extrato de maracujá veiculado na dieta, na dose de 100 mg/Kg, protege juvenis de tilápia da depleção dos estoques de glicogênio hepático causada pelo estresse social.

Palavras-Chave: Hepatócito, Histologia, Metabolismo Intermediário, *Oreochromis niloticus*, *Passiflora incarnata*.

ABSTRACT

OLIVEIRA, R.H.F. **Effect of Passion fruit (*Passiflora incarnata*) on the hepatocytes morphometry of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2008. 59 p. Dissertation M.Sc. – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2008.

Effects of Passion fruit (*Passiflora incarnata*) dry extract administration on hepatocyte morphometry of juveniles Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) were investigated. Male isolated fish ($86,50 \pm 10,17$ g) were daily fed (28 days) with extruded commercial ration (32% crude protein - 2% biomass) containing the extract diluted in sodium alginate in graded doses 0 (control), 50, 100 and 200 mg/Kg (n= 6 animals/treatment), registering daily consumption. At the start and after 28 days of experiment each fish was displayed to the reflection of own mirror image (30 minutes) in order to simulate the virtual presence of a coespecific (social stress). Then the animals were anesthetized (2-fenoxietanol) for biometric measures and blood collection (caudal vein) for determination of the plasmatic levels of glucose and cortisol. After 28 days the animals were sacrificed for removal of liver fragments samples used to histological examination (cytoplasmic area and number of cells – HE stained; hepatic glycogen supplies - PAS stained). Aiming the comparison of the natural social stress with that utilized in this experiment, six fish from a group of 30 individuals were also sacrificed and used as reference (basal values) for the histological parameters evaluation. Food consumption, weight gain and sanguine biochemist parameters (cortisol and glucose) were submitted to ANOVA, SAS 8.0 proc mixed ($p < 0,05$) and data of cells counting and hepatocyte morfometry to the same test, using SAS 8.0 GLM ($p < 0,01$). The initial weights and lengths were similar, the food consumption was not modified by the addition of the extract and all the fish grew significantly during the experiment. Initial levels of cortisol and glucose were also similar between groups and did not modify by the stressor agent or treatments with the extract. However, a significant increase of glucose and reduction of cortisol levels were observed for all the fish. The addition of different extract doses provoked significant and noticeable increase of the cytoplasmic area and reduction of the cells number, mainly for 100 mg/Kg dose. In the control group cytoplasmatic area was significantly minor due to lesser hepatic glycogen accumulation. The stressor agent did not affect sanguine biochemists parameters but seems to lead metabolic alterations that had collaborated with the depletion of liver glycogen supplies. This effect seems to have been reverted in the fish that received the diet contend Passion fruit extract that, by means of a mechanism not elucidated in this experiment, contributed for the maintenance or increase of hepatic glycogen supplies. It was conclude that Passion fruit extract diet inclusion at 100 mg/Kg dose protects the tilapia against the hepatic glycogen depletion caused by social stress

Keywords: Hepatocyte, Histology, Intermediary Metabolism, *Oreochromis niloticus*, *Passiflora incarnata*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	51
Anexo A - Boletim de análise do extrato seco de <i>Passiflora Incarnata</i>	52
Anexo B - Boletim microbiológico do extrato seco de <i>Passiflora Incarnata</i>	53
Anexo C - Especificações do extrato seco de <i>Passiflora Incarnata</i>	54

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O estresse é definido como um estado de desequilíbrio que desencadeia ajustes fisiológicos ou respostas adaptativas dos peixes permitindo o restabelecimento da homeostasia (PICKERING, 1981; CHROUSOS, 1998).

De acordo com Barton (2002) os peixes podem ser expostos a três tipos básicos de agentes estressores: **químicos** (contaminantes e poluentes), **físicos** (manejo, captura e confinamento durante o transporte) e **sensoriais** (“perceived stressors” - presença de um predador). As respostas a estes agentes são classificadas como **primárias** (agudas), quando ocorre o aumento dos hormônios corticosteróides e das catecolaminas e alteração da atividade dos neurotransmissores, **secundárias** que desencadeiam mudanças metabólicas como o aumento da glicose e do lactato e a redução do glicogênio tecidual, distúrbios na osmorregulação e alterações celulares e de fatores sanguíneos e imunológicos (produção de anticorpos) e **terciárias** que promovem déficit de crescimento, redução capacidade locomotora, imunossupressão e alterações do comportamento alimentar e social.

O esquema dos principais elementos que participam da resposta ao estresse nos peixes teleósteos é apresentado na **Figura 1**.

Figura 1 Esquema geral dos principais elementos que participam da resposta ao estresse nos peixes teleósteos. ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), MSH (hormônio estimulador do melanóforo) βEND (beta-endorfina). Adaptado de Sjoerd e Wendelaar-Bonga (1997).

Embora o estresse seja um processo natural adaptativo, quando crônico é denominado pelos criadores e aquaculturistas de “distress”, comprometendo a saúde, bem-estar e capacidade de adaptação do animal, podendo também ocasionar imunossupressão e morte (BARTON e IWANA 1991; HEATH, 1995; BARTON, 2002).

As relações sociais existentes nos grupos também são potentes agentes estressores encontrados no ambiente natural, porém agravados pelo sistema de criação onde há limitação do espaço disponível (KOEBELE, 1985; VOLPATO et al. 1989). No confinamento de pequenos grupos, é estabelecida uma hierarquia social e os peixes submissos apresentam coloração escura, redução da taxa de crescimento, redução de linfócitos dos tecidos hematopoiéticos, aumento da atividade interrenal e maior índice de mortalidade, comparativamente aos dominantes (YAMAGISHI, 1962; LI e BROCKSEN, 1977; NOAKES e LEATHERLAND, 1977; PETERS e SCHWARZER, 1985; LAIDLEY e LEATHERLAND, 1988).

Nos sistemas de criação o estresse pode afetar negativamente a produtividade, pois são impostas situações diferentes daquelas do habitat natural como manejos constantes, capturas, altas densidades de estocagem e condições inadequadas da água relacionadas à temperatura e oxigenação, além da poluição e dos confrontos sociais (NOAKES e LEATHERLAND, 1977; SJOERD e WENDELAAR – BONGA, 1997). Nesta condição a dominância social, o comportamento agressivo e a competição intra-específica são observados principalmente em espécies territoriais como a truta e o salmão (*Oncorhynchus kisutch*), causando redução do crescimento e imunossupressão (REDDY e LEATHERLAND, 1998).

Assim como os demais agentes potencialmente estressores, as relações sociais provocam aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas e de cortisol com uma conseqüente mobilização de substratos energéticos (PICKERING e CHRISTIE, 1981; BONGA, 1997; FERNANDES, 1997; IWAMA, 1997; CORREA, 2001; CORREA et al 2003) que reduz a taxa de crescimento e a capacidade imunológica e reprodutiva (DONALDSON, 1981; MOBERG, 1985; BARTON e IWAMA, 1991; PICKERING, 1993).

A redução da taxa de crescimento está relacionada à mobilização de lipídios e aminoácidos decorrente da elevação dos níveis de cortisol após a exposição ao agente estressor (LEACH e TAYLOR, 1982; DAVIS et al. 1985; SHERIDAN, 1986; VIJAYAN e

LEATHERLAND, 1988; VIJAYAN et al. 1994 a,b; REDDY et al. 1995). Este hormônio atua sobre as vias metabólicas estimulando enzimas-chaves transaminases envolvidas na neoglicogênese hepática, no bloqueio da assimilação da glicose pela musculatura lisa e pelo tecido adiposo, aumento da proteólise e diminuição da síntese de proteínas (BARTON e IWANA, 1991). Seu excesso também compromete a absorção intestinal de cálcio, prejudicando a formação de colágeno e de matriz óssea resultando na diminuição da massa muscular (AIRES, 1991). Assim, os níveis circulantes de cortisol são empregados rotineiramente como indicadores do estresse em peixes (BARTON e IWAMA 1991; WENDELAAR - BONGA, 1997).

O estresse agudo e crônico a provoca elevação dos níveis plasmáticos de cortisol e de glicose nos peixes (PETERS et al. 1980; KUBOKAWA et al. 1999), fato atribuído anteriormente por Miles et al. (1974) McLEAY (1977); Mazeaud e Mazeaud (1981) ao aumento da glicogenólise hepática. Portanto, a quantificação da glicose sanguínea caracteriza-se como um método eficaz para avaliação do estresse nos peixes (WEDEMEYER et al. 1990; ANDERSEN et al. 1991; THOMAS e ROBERTSON, 1991; CHEN et al. 1995; CECI et al. 1996; REUBUSH e HEATH, 1996; ROTLLANT e TORT, 1997; ORTUÑO et al. 2001, 2002, EVANS et al. 2003).

Apesar dos parâmetros bioquímicos sanguíneos serem uma importante ferramenta para a avaliação da sanidade humana e animal, informações sobre os valores basais de referências são escassas e variam muito entre as espécies (MAUEL et al. 2007). A análise destes parâmetros é dificultada quando se trata da aquicultura em decorrência das poucas informações disponíveis sobre os valores basais normais e falta de referências para realização das análises (GROFF e ZINKL, 1999). De acordo com Chen et al. (2003) seu uso é limitado pela falta de padronização de protocolos de amostragem e determinação dos parâmetros, além da interferência de fatores ambientais, sociais e fisiológicos. Segundo Evans et al. (2003) as concentrações de glicose sanguínea variam de acordo com a espécie estudada, tipo e duração do estresse e condições de criação dos peixes.

De acordo com De Silva e Anderson (1995) nos vertebrados, incluindo os peixes, a glicose destaca-se como o principal monossacarídeo circulante que atua como substrato energético nos vertebrados, incluindo os peixes, e está relacionada a quatro

padrões de reação: a glicólise (quebra da glicose com liberação de energia), gliconeogênese (síntese de glicose a partir de outras moléculas), síntese de glicogênio (estocagem do excesso de glicose) e quebra de glicogênio (liberação de glicose na forma livre). Os carboidratos são absorvidos no trato digestório, entrando na corrente sanguínea na forma de monossacarídeos como glicose, frutose, galactose, entre outros, e são armazenados na forma de glicogênio muscular e hepático (hepatócitos) de forma a fornecer energia necessária em condições estressantes como altas densidades de estocagem, hipóxia, ou falta de alimentação (WENDELAAR - BONGA, 1997).

A capacidade de utilização dos carboidratos nos peixes é inferior à dos demais animais domésticos (NRC, 1981; 1983; CHRISTIANSEN e KLUNGSOYR, 1987) e varia entre as espécies devido a diferenças anatômicas e funcionais do trato digestório e órgãos anexos, observando-se então maior habilidade entre os onívoros, comparativamente aos carnívoros (KROGDAHL et al. 2005). Mesmo as espécies mais tolerantes apresentam níveis plasmáticos muito mais elevados deste substrato e retorno mais lento aos níveis basais, comparativamente às espécies de mamíferos onívoros (COWEY, 1988). Porém, os peixes não devem ser considerados animais diabéticos (HUNG, 1991; WILSON, 1994).

O tempo de manutenção da hiperglicemia nos peixes varia de modo marcante entre as espécies, sendo os carnívoros menos tolerantes à glicose, comparativamente aos onívoros (FURUICHI e YONE, 1981; HARMON et al. 1991; GARCIA-RIERA e HEMRE, 1996). Por exemplo, a capacidade de regulação dos níveis de glicose na carpa (onívoro) é superior à dos peixes carnívoros, uma vez que o restabelecimento dos níveis basais de glicose plasmática ocorre após somente cinco horas (FURUICHI e YONE, 1981; SHIKATA et al. 1994).

A glicose pode também ser armazenada no tecido muscular e nos hepatócitos na forma de glicogênio que é mobilizado nas condições de estresse (WENDELAAR - BONGA, 1997). Na espécie *Onchorynchus mykiss*, Vijayan e Moon (1992) registraram redução dos níveis de glicogênio hepático causada pela restrição alimentar e condições de hipóxia. Em tilápias mossâmbicas Vijayan et al. (1997) observaram após estresse de confinamento um aumento da atividade de enzimas relacionadas a gliconeogênese.

Os hepatócitos dos peixes estão envolvidos no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos (ROBERTS, 1989), atividade controlada por uma variedade de hormônios como as catecolaminas e os corticosteroides que participam da resposta primária do estresse nos peixes (DONALDSON, 1981; ROBERTS, 1989; BOOM et al. 1991, VIJAYAN e MOON, 1992). De acordo com Dalmo et al. (1997) o estresse pode provocar alterações bioquímicas que resultam em danos celulares que são detectados por meio de exames histológicos nos peixes.

Assim, alterações teciduais hepáticas como depleção do glicogênio podem ser utilizadas para avaliar o “nível” de estresse nas condições de criação (WEDEMEYER, 1996). Santos et al. (2004) observaram em tilápias do Nilo, provenientes de ambiente poluído, alterações hepáticas condizentes com redução da concentração de glicogênio. Vijayan et al. (1990), Vijayan e Moon (1992) e Paxton et al. (1994) demonstraram que a quantidade deste substrato nos hepatócitos dos peixes é reduzida pela exposição a um agente estressor, em decorrência da ativação de enzimas glicolíticas via catecolaminas.

Peixes submetidos a estresse crônico podem apresentar alterações patológicas em outros tecidos, além do fígado como hipertrofia interrenal, atrofia da mucosa gástrica e alterações celulares do baço. Deste modo, alterações teciduais gástricas como redução do diâmetro das células mucosas podem também ser utilizadas como indicadores de estresse social, como observado no cultivo de enguias (PETERS et al. 1981).

Embora Figueiredo-Fernandes et al. (2007) considerem que o estudo da morfologia hepática é dificultado por vários fatores como a grande diversidade intra e interespecífica (20.000 a 25.000 espécies descritas), o fígado é considerado um modelo interessante para avaliação dos efeitos das variações ambientais sobre os peixes, respondendo de modo mais pronunciado do que a maioria dos mamíferos (BRUSLÉ e ANADON, 1996). De acordo com BRUSLÉ e ANADON (1996) nos peixes e demais vertebrados este órgão desempenha funções vitais no organismo como anabolismo (proteínas, lipídios e carboidratos) e catabolismo (nitrogênio, glicogenólise e desintoxicação), sendo considerado um órgão alvo para avaliação dos efeitos da alimentação, poluentes, toxinas, parasitas e microorganismos que podem alterar a sua estrutura e metabolismo.

De acordo com Baccarin et al. (2000) fígados expostos à injúria produzem um acúmulo anormal de lipídeos nas células parenquimatosas, processo denominado esteatose hepática e que pode ser provocado, dentre outros fatores, pela deficiência de aminoácidos sulfurados na dieta. Segundo Russel et al. (2001) alterações hepáticas como acúmulo expressivo de gordura ou de glicogênio e a palidez têm sido detectadas nos peixes cultivados mantidos por longos períodos com dietas de alto valor energético.

A desintoxicação de produtos poluentes e xenobióticos nos peixes teleósteos, assim como verificado entre demais vertebrados, ocorre por meio da filtração no fígado (QUABIUS et al. 1998). Nos peixes, metais pesados podem afetar este e outros órgãos e inúmeros efeitos histopatológicos como reforço reticular dos hepatócitos e migração de leucócitos têm sido descritos (BORGES et al. 2003). Segundo Cicik e Engin (2005) a presença de metais como o cádmio pode provocar alterações no metabolismo de carboidratos, refletidas na redução das reservas de glicogênio hepático em decorrência da ativação de enzimas relacionadas a glicogenólise.

Devido aos evidentes impactos biológicos e econômicos do estresse sobre os peixes, formas alternativas para promover o aumento do índice de sobrevivência e do bem-estar como o emprego de drogas anestésicas, hipnóticas e de sais são utilizadas e pesquisadas. Os anestésicos têm como função primária reduzir o metabolismo e conseqüentemente o consumo de oxigênio e o acúmulo de resíduos tóxicos, enquanto que os sais apresentam função protetora contra desequilíbrio osmótico decorrente da exposição crônica a um determinado agente estressor (CARMICHAEL, 1984).

A possibilidade de redução dos efeitos do estresse por meio de produtos naturais tem sido estudada principalmente em humanos e outros mamíferos como ratos, camundongos e suínos, destacando-se entre estes o maracujá (SOULIMANI et al. 1997 SPERONI e MINGHETTI, 1998 PEETERS et al. 2004). Este vegetal pertence ao gênero *Passiflora* que compreende cerca de 500 espécies da família Passifloraceae amplamente distribuídas nas regiões tropicais do Ocidente as quais se destacam por suas características fitoterápicas (RENDLE, 1959; HICKEY e KING, 1988; BERGNER, 1995; DHAWAN et al. 2004).

No maracujá são encontradas substâncias como os derivados pirônicos (maltol), alcalóides harmônicos e flavonóides aos quais são atribuídos efeitos sedativos e ansiolíticos (SPERONI et al. 1996 a;b; SOULIMANI et al. 1997, DHAWAN et al., 2001a).

As diferentes espécies de *Passiflora* podem ser identificadas de acordo com a qualidade e quantidade de flavonoídes presentes como a vitexina e isovitexina, típicos do *P. incarnata* (GRICE et al. 2001).

A espécie *Passiflora incarnata* é utilizada no tratamento da insônia, ansiedade e distúrbios do sistema nervoso central em humanos (DHAWAN et al., 2003), podendo ser combinada a *Valeriana officinalis* e *Melissa officinalis* (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). De acordo com Taylor (1986) e Carlini (2003) é empregada como sedativa, analgésica, antiespasmódica, antiasmática e anti-helmíntica e ansiolítica e segundo Negraes, et al. (2003) possui efeitos calmantes, fato confirmado pelo Ministério da Saúde no Brasil.

A maioria das pesquisas avalia os efeitos da *P. incarnata* em mamíferos como camundongos, ratos e suínos. Nos ratos observaram-se efeitos neurofarmacológicos como indução do sono e locomoção após a administração do extrato fluído nas doses de 400 e 800 mg/Kg (SOULIMANI et al. 1997 SPERONI e MINGHETTI, 1998), e atividade ansiolítica em ratos em doses de 125mg/Kg (DHAWAN et al. 2001b). Peeters et al. (2004) observaram efeito ansiolítico e calmante (redução do batimento cardíaco) após a administração da combinação de dois extratos vegetais a *P. incarnata* e a *Valeriana officinalis* em suínos submetidos a estresse de transporte.

Embora existam muitas semelhanças entre os peixes e mamíferos em relação aos neurotransmissores envolvidos na regulação do comportamento agonístico e do estresse, mecanismos filogeneticamente muito antigos e conservados durante os últimos 400 milhões de anos na evolução dos vertebrados (WINBERG E NILSSON, 1993), não são encontradas referências sobre o emprego de *Passiflora* na promoção do bem-estar nestes animais. Num único estudo encontrado relacionado aos peixes, observou-se que o extrato seco de *P. incarnata* veiculado à dieta de tilápias do Nilo não afetou negativamente a ingestão e o desempenho (BARONE, 2006).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da administração contínua do extrato de maracujá veiculado na dieta sobre a morfologia dos hepatócitos

de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a estresse social, oferecendo subsídios para avaliação da viabilidade do emprego deste produto natural na redução do estresse e promoção do bem estar da espécie.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Comportamento de Peixes (LACOPE) do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP Pirassununga no período de Abril a Maio de 2006. Machos juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) provenientes de piscicultura comercial (Piscicultura Santa Cândida - Santa Cruz da Conceição, SP, Brasil) foram mantidos durante 30 dias em tanques de 250L (Figura 2) contendo filtro biológico, sob temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12 horas artificialmente imposto por meio de lâmpadas fluorescentes acionadas por timer (6:00 h), para aclimação às condições laboratoriais.

Figura 2 Tanque para aclimação dos peixes.

A alimentação foi fornecida *ad libitum* utilizando-se ração comercial peletizada (Laguna Tilápia Crescimento marca Socil – Evialis Nutrição Animal Indústria e Comércio – Ltda.) contendo 32% de proteína bruta (PB), duas vezes ao dia (9:00 h e 17:00 h).

Após a aclimação, os peixes foram anestesiados em 2-fenoxietanol (0,5 ml/L de água durante 2 minutos) e triados para seleção de 24 exemplares de tamanhos próximos (peso médio de $86,50 \text{ g} \pm 10,17 \text{ g}$ e comprimento padrão de $14,02 \text{ cm} \pm 0,77 \text{ cm}$), que foram transferidos individualmente para unidades experimentais (aquários de vidro) com capacidade para 27L (30 x 30 x 30 cm). Cada unidade foi equipada com filtro biológico externo, aquecedor de 30 Watts controlado por uma unidade central (Shiruba H-800 Therm Controller) e revestimento externo de placas de isopor que proporcionaram aos peixes o isolamento térmico, químico e visual (Figura 3).

Figura 3 Vista geral das unidades experimentais (esquerda) e animal durante aclimação (direita).

Registrou-se diariamente a temperatura e, semanalmente, a qualidade da água foi avaliada quantificando-se o pH e as concentrações de oxigênio (HORIBA – Water Quality Checker U-10), amônia (Hanna Instruments – Microprocessador Ammonia Meter – HI 93700) e nitrito (Hanna Instruments – Microprocessador Nitrite Meter – HI 93707) dissolvidos.

Diariamente, após a alimentação no período da tarde (17:00 h), realizou-se a limpeza das unidades experimentais por meio de aspiração de resíduos alimentares e de excretas, substituindo-se 20% do volume da água de cada uma.

Os indivíduos foram considerados aclimatados às unidades experimentais quando constatadas características indicativas de bem-estar tais como coloração pálida do corpo e olhos (VOLPATO et al. 2003).

Após a aclimação às unidades experimentais os peixes foram submetidos durante 28 dias a quatro tratamentos (seis peixes cada) caracterizados pela substituição da ração comercial por ração suplementada com extrato seco comercial de folhas de *P. incarnata* (L.) (Grupo Centroflora/Anidro – 3.5-3.9% de flavonóides totais calculados como vitexina - Lote 02080411129) incorporado em alginato de sódio (Synth – Lote A108901 AS).

Para o preparo de 100 gramas da dieta experimental, o alginato de sódio (veículo) foi pré-solubilizado em água destilada (0,5 g/100 mL), pipetando-se 20 mL desta solução e misturando-se ao extrato seco de *P. incarnata* para a preparo das doses estabelecidas (250, 500 e 1000 mg). A solução resultante foi aspergida sobre os peletes que foram submetidos à secagem em temperatura ambiente e armazenamento sob refrigeração (18°C) em frascos plásticos vedados. Para melhor ilustrar este procedimento tomando-se um peixe de 1000 gramas, que recebeu 2% da sua biomassa (20 gramas) foram necessários 250, 500 e 1000 mg do extrato para a obtenção das doses de 50, 100 e 200 mg/Kg diária.

Peixes controle (n=6) foram alimentados com ração recoberta somente com alginato de sódio (controle – sem suplementação com o extrato de *Passiflora*) e os demais receberam ração comercial (2% biomassa/dia) suplementada com o extrato nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg.

Para verificação da presença de açúcares redutores totais no extrato empregado neste estudo utilizou-se o método do DNS (ácido dinitro salicílico) descrito por Miller (1959), procedimento realizado no Laboratório de Bioprocessos da FZEA/USP, Pirassununga.

Os peixes receberam as dietas na proporção de 2% da biomassa, duas vezes ao dia (9:00 e 17:00h), anotando-se a ingestão diária de cada indivíduo e reajustando-se as quantidades semanalmente com base no ganho de peso.

No início e ao final do experimento (28 dias) cada peixe foi submetido durante 30 minutos à reflexão da própria imagem em espelho visando indução de um estresse social provocado pela presença virtual de um coespecífico. Após este procedimento os animais foram individualmente capturados, anestesiados (2-phenoxyethanol 0,5 mL/L de água durante dois minutos), pesados (Balança eletrônica - GEHAKA - BG1000) e medidos (comprimento padrão obtido por meio de paquímetro Mitutoyo) para avaliação de seu desempenho, por meio do ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) e fator de condição de Fulton (k). O ganho de peso expresso em gramas foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$GP = Pf - Pi \text{ (onde: } Pf = \text{peso final e } Pi = \text{peso inicial)}$$

A Taxa de Crescimento Específica expressa em porcentagem de ganho de peso por dia foi determinada pela seguinte fórmula, onde (ln = logaritmo neperiano).

$$TCE = [(ln \text{ peso final} - ln \text{ peso inicial}) / \text{tempo}] \times 100$$

O Fator de condição de Fulton (k), calculado de acordo com a metodologia de Le Cren (1951) e foi determinado pela seguinte expressão, onde (Wt = peso total dos peixes e Lt = comprimento total).

$$k = Wt / Lt^3 \times 100$$

Após realização de cada biometria realizaram-se, por meio de seringas descartáveis (Injex[®] - 1mL Insulina – Lote 2279) heparinizadas (Liquemine[®] - Roche 1434802BR001), coletas amostras de sangue (0,5 mL) da veia caudal (Figura 4). As amostras foram transferidas para tubos de Eppendorf e centrifugadas durante 15 minutos a 3.000 rpm e 4°C, congelando-se o plasma (-30°C) para análise dos níveis plasmáticos de cortisol e de glicose (0, 7, 14, 21, e 28 dias).

Figura 4 Coleta de sangue por punção da veia caudal.

Utilizaram-se kits comerciais para análise da glicose total (método enzimático – Laborlab – Produtos para laboratórios Ltda – Lote 431). Os níveis plasmáticos de cortisol foram medidos por radioimunoensaio (EIA) com inter e intra-ensaios com coeficiente de variação de 1,97 ng/mL e 0,96 ng/ml, respectivamente, usando Kits comerciais (método imuno-enzimático KIT DSL-10-2000 ACTIVE® Cortisol Enzima Imunoensaio – EIA – Gênese Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos Ltda Lote 10224-B). As lavagens das microplacas e as leituras foram realizadas por meio de lavadora de microplacas e leitor ELISA (Lkasytem Multiskan MS), localizados no Laboratório de Fisiologia Animal no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP Pirassununga.

Visando a avaliação dos parâmetros histológicos (morfometria do tecido hepático), todos os peixes foram anestesiados, insensibilizados em gelo na proporção de 1:3 (gelo/água) e decapitados. Para efeito de comparação dos efeitos do estresse social natural (valores basais de referência) com aquele empregado no experimento (presença virtual do coespecífico), outros seis indivíduos, mantidos em laboratório na

condição de agrupamento com 30 coespecíficos, durante 28 dias, foram também sacrificados.

Para confecção das lâminas, cada animal foi imediatamente eviscerado, coletando-se e fixando-se o fígado durante 24 horas em solução de Bouin (70% de solução de ácido pícrico saturada, 25% formol e 5% de ácido acético). Após este período as amostras foram conservadas em álcool 70% e fragmentadas por meio de lâminas cortantes.

Os fragmentos de tecido hepático foram incluídos em parafina visando à obtenção de cortes na espessura de seis micrômetros que foram corados, a princípio, pela Hematoxilina e Eosina para visualização do citoplasma e núcleo. Posteriormente outras lâminas foram confeccionadas utilizando-se o método histoquímico de PAS (ácido periódico de Shiff) para observação do glicogênio hepático e posteriormente para confirmação do glicogênio à prova da amilase.

Os procedimentos histológicos foram realizados nos Laboratórios de Histologia e de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) localizados no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos USP.

Os cortes foram realizados por meio de micrótomo (Leica - modelo RM 2055) e as imagens foram observadas em microscópio óptico acoplado a um sistema digital, fotografando-se os campos para análise por meio do software Axiovision 4.1 (Figura 5).

Figura 5 Microscópio óptico utilizado para obtenção das imagens digitais.

Para obtenção das imagens digitais, de cada lâmina foram selecionados aleatoriamente 10 fragmentos dos quais foram registradas 10 fotos em objetiva de 40X.

Em cada imagem digital registrada quantificou-se o número total de células do campo e em 10 células de cada campo, selecionadas aleatoriamente, mediu-se a área do núcleo e do citoplasma por meio de um software (Axiovision 4.1) parte integrante do computador acoplado ao microscópio óptico Axioplan II (Figura 6).

Figura 6 Detalhe da tela do programa utilizado para morfometria e contagem das células.

Os dados relacionados à biometria, consumo de alimento e parâmetros bioquímicos sanguíneos foram submetidos a ANOVA de um modelo com medidas repetidas, que incluiu os fatores tratamento, coleta e a interação tratamento x coleta. Utilizou-se nessas análises o proc mixed do SAS 8.0, adotando-se $p < 0,05$.

Os dados referentes aos parâmetros histológicos (número de células e morfometria dos hepatócitos) foram também submetidos a ANOVA, incluindo os fatores tratamento, coleta e a interação tratamento x coleta, utilizando-se o GLM do SAS 8.0 e $p < 0,01$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros indicadores da qualidade da água foram mantidos em valores adequados e recomendados para a manutenção da espécie, conforme VINATEA (2004). A temperatura média permaneceu em $27,9^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, o oxigênio dissolvido em $5,66 \pm 0,07$ mg/L, o pH em $7,03 \pm 0,17$ e as concentrações de amônia e nitrito $0,04 \pm 0,01$ mg/L, não havendo diferença entre os tratamentos.

Os dados da biometria e do consumo de alimento são apresentados na **Tabela 1**. Verificou-se que os pesos e os comprimentos iniciais não diferiram e que todos os peixes cresceram significativamente ao longo do experimento, não havendo efeito dos tratamentos sobre nenhum dos parâmetros avaliados. Deve-se destacar que não ocorreu mortalidade e nenhum sinal de enfermidade foi observado, fato que também corrobora com a idéia de condições adequadas de manutenção dos peixes.

Tabela 1 Dados da biometria e do consumo alimentar de juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratados com extrato seco de maracujá (*Passiflora incarnata*) veiculado na dieta nas doses 0, 50, 100 e 200 mg/Kg biomassa, durante 28 dias.

Tratamentos	Basal	0	50	100	200
Parâmetros					
Peso Inicial (g)	-	$86,0 \pm 5,0^{aA}$	$88,6 \pm 7,6^{aA}$	$85,5 \pm 5,6^{aA}$	$83,9 \pm 6,1^{aA}$
Peso Final (g)	$98,36 \pm 18,0^B$	$97,1 \pm 10,3^{bB}$	$96,0 \pm 7,1^{bB}$	$102,1 \pm 11,9^{bB}$	$96,2 \pm 11,7^{bB}$
Comprimento Inicial (cm)	-	$13,1 \pm 0,5^{aA}$	$13,4 \pm 0,8^{aA}$	$13,4 \pm 0,5^{aA}$	$13,2 \pm 0,5^{aA}$
Comprimento Final (cm)	$14,76 \pm 0,7^B$	$14,5 \pm 0,4^{bB}$	$14,6 \pm 0,3^{bB}$	$14,8 \pm 0,6^{bB}$	$14,5 \pm 0,3^{bB}$
Consumo Total (%)	-	$79,1 \pm 16,6^b$	$73,8 \pm 17,4^b$	$80,2 \pm 15,2^b$	$77,4 \pm 15,1^b$
Ganho em Peso	-	$11,1 \pm 1,3^A$	$11,0 \pm 1,3^A$	$14,6 \pm 1,4^A$	$10,2 \pm 1,3^A$
TCE	-	$0,4 \pm 0,1^A$	$0,4 \pm 0,1^A$	$0,5 \pm 0,1^A$	$0,4 \pm 0,1^A$
FC	-	$3,3 \pm 0,1^A$	$3,3 \pm 0,1^A$	$3,4 \pm 0,1^A$	$3,3 \pm 0,1^A$

* Médias com letras minúsculas, sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

** Médias com letras maiúsculas, sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

O Fator de condição de Fulton (k), ferramenta comumente utilizada para avaliar o grau de higidez ou de bem estar dos peixes, está relacionado às condições ambientais, etológicas, de alimentação recente ou de gasto dos estoques de substratos energéticos (VAZZOLER, 1996). Este parâmetro varia com a temperatura e disponibilidade de alimento, podendo ser utilizado para avaliação de alterações alimentares e populacionais em determinado ambiente (BRAGA, 1986; DÓRIA e LEONHARDT 1993).

Ali et al. (2008) registraram para alevinos de *O. Niloticus* submetidos a dietas com diferentes taxas de proteína/energia valores de k entre 2,65 e 3,18, enquanto Coda (1996) e Leonhardt e Urbinati (1999) obtiveram respectivamente valores entre 2,0 e 2,19 e entre 1,40 e 1,44. No presente experimento, os valores de k permaneceram na faixa entre 3,3 e 3,4, considerada normal para a espécie, e não foram alterados pelo tratamento com o extrato, independentemente da dose empregada. Este dado também corrobora com a idéia de que os peixes foram mantidos em condições adequadas e apresentavam bom estado nutricional.

Na **Tabela 2** são apresentados os dados da bioquímica sanguínea dos peixes. Observou-se que os níveis de cortisol plasmático e de glicose não diferiram inicialmente entre os grupos e que não foram alterados pelos tratamentos com diferentes doses de extrato de maracujá.

A interpretação dos valores da bioquímica sanguínea é freqüentemente dificultada pela variabilidade dos valores considerados “normais” e basais descritos na literatura, fato destacado por Groff e Zinkl (1999), Chen et al. (2003) e Mauel et al. (2007). Segundo estes autores, esta variabilidade decorre da falta de padronização de metodologias e de referências para realização das análises, além da interferência de variáveis ambientais, sociais, fisiológicas e intraespecíficas.

Vijayan et al. (1997) registraram para a espécie *Oreochromis mossambicus* valores basais da glicose sangüínea entre 40 e 50 mg/dL e entre 180 e 210 mg/dL após aplicação de estresse de confinamento. Hrubec et al. (2000) e Mauel et al. (2007) observaram valores basais entre 30 e 137 mg/dL para tilápias híbridas. Para a espécie *O. niloticus* Chen et al (2003) registraram valores entre 85,4 e 90,2 mg/dL em animais com pesos entre 324,5 e 453,3 g. Hussein et al (1996) obtiveram valores médios de

52,33 mg/dL para indivíduos de 38,46 g e Benli e Yuldis (2004) $21,87 \pm 0,4$ mg/dL para aqueles com $21,43 \pm 6,78$ g.

Tabela 2 Níveis de cortisol plasmático ($\mu\text{g/dL}$) e glicose (mg/dL) de juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratados com extrato seco de maracujá (*Passiflora incarnata*) veiculado na dieta nas doses 0, 50, 100 e 200 mg/Kg biomassa, durante 28 dias. Dados obtidos após exposição à própria imagem refletida em espelho durante 30 minutos.

Tratamentos	0	50	100	200
Parâmetros				
Cortisol Inicial	$13,7 \pm 4,3^{aA}$	$14,4 \pm 5,9^{aA}$	$15,9 \pm 6,3^{aA}$	$14,5 \pm 3,9^{aA}$
Cortisol final	$3,8 \pm 0,7^{bB}$	$8,1 \pm 6,7^{bB}$	$6,2 \pm 5,0^{bB}$	$4,2 \pm 0,5^{bB}$
Glicose Inicial	$44,3 \pm 4,9^{aA}$	$48,3 \pm 8,3^{aA}$	$45,0 \pm 4,1^{aA}$	$49,1 \pm 11,7^{aA}$
Glicose Final	$59,5 \pm 6,7^{bB}$	$61,0 \pm 10,1^{bB}$	$66,4 \pm 8,3^{bB}$	$66,9 \pm 6,5^{bB}$

* Médias com letras minúsculas, sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

** Médias com letras maiúsculas, sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

No presente trabalho observou-se no decorrer do experimento um aumento significativo e semelhante dos níveis de glicose nos peixes submetidos a todos os tratamentos, inclusive entre os animais que não receberam a dieta contendo extrato de maracujá. Os valores iniciais variaram entre 44,3 e 49,1 mg/dL e os finais entre 59,5 e 66,9 mg/dL, com taxa de elevação da glicemia de 34,3%, 26,3%, 47,6% e 36,3% respectivamente para os tratamentos 0, 50, 100 e 200 mg/Kg.

Embora os níveis de glicose tenham permanecido em níveis inferiores àqueles registrados na literatura para peixes submetidos a agentes potencialmente estressores e as alterações tenham sido semelhantes para todos os tratamentos estabelecidos, deve-se destacar a maior variação (elevação) observada nos animais submetidos ao tratamento com 100 mg/Kg do produto.

O aumento dos níveis sanguíneos de glicose pode decorrer da ativação do eixo hipófise-hipotálamo após exposição a um agente potencialmente estressor (PETERS et al., 1980; BARTON e IWANA, 1991; KUBOKAWA et al., 1999; EVANS et al., 2003) o

que seria esperado neste trabalho onde os peixes foram submetidos durante 30 minutos à reflexão da própria imagem refletida em espelho de modo a simular a presença de um coespecífico (estresse social). De acordo com Wirtz e Davenport (1976) a tilápia não reconhece a própria imagem e passa a emitir comportamentos agonísticos, inerentes a esta espécie de hábito territorial e observados durante o estabelecimento da hierarquia social de dominância.

Porém, esses comportamentos não foram exibidos pelos peixes de nenhum tratamento e o clássico aumento dos níveis plasmáticos de cortisol após a exposição a um agente estressor não foi observado. Os valores inclusive permaneceram baixos, oscilando entre 3,8 e 15,9 ng/mL, considerados normais para a espécie. Em ciclídios como a espécie *O. mossambicus* os níveis basais de cortisol variam entre 20 e 60 ng/mL (VIJAYAN et al. 1997) e para a espécie *O. niloticus* entre 5 e 60 ng/mL (BARCELLOS et al. 1999; VOLPATO e BARRETO, 2001; CORREA et al. 2003; BISWAS 2004; BARRETO e VOLPATO 2006). Assim, os dados da bioquímica sanguínea obtidos no presente experimento corroboraram, em princípio, com a idéia de que o agente estressor empregado não tenha sido efetivo.

Segundo Hung (1991) e Wilson (1994) os peixes possuem uma baixa capacidade de metabolizar carboidratos, fato que resulta numa elevação dos níveis de glicose sanguínea por longos períodos. Porém, os peixes não devem ser considerados animais diabéticos (HUNG, 1991; WILSON, 1994). De acordo com Furuichi e Yone, (1981); Harmon et al., 1991; Garcia-riera e Hemre, (1996), a administração de glicose nos peixes provoca uma prolongada hiperglicemia com variação do tempo de metabolização entre carnívoros e onívoros.

A tilápia do Nilo, sendo um peixe onívoro, é capaz de metabolizar de modo mais eficiente os carboidratos da dieta, convertendo-os em açúcares mais simples que são utilizados como substrato energético ou armazenados na forma de glicogênio muscular e hepático (RUSSELL et al., 2001). Assim o aumento observado na glicemia no presente trabalho poderia ter decorrido da ingestão diferencial do alimento, possibilidade que foi descartada pelo fato dos peixes submetidos a todos os tratamentos terem apresentado taxas semelhantes de ingestão da dieta.

Outra variável que poderia ter interferido nos resultados da glicemia seria a presença de açúcares no extrato de maracujá utilizado. De fato, comprovou-se pelo método de Miller (1959) a presença de açúcar redutor total na concentração de 23,7 g/Kg da amostra. Porém este dado não explica o aumento da glicemia observado no grupo controle que recebeu a dieta isenta de extrato e, portanto, uma quantidade menor de açúcar.

Os dados da avaliação histológica do fígado, objetivo principal deste estudo, são apresentados na **Tabela 3**. O parênquima observado mostrou-se homogêneo e de acordo com o padrão de normalidade descrito por Figueiredo-Fernandes et al. (2006) para a mesma espécie, não sendo observadas diferenças entre os tratamentos.

Tabela 3 Contagem de células (n=290 campos) e morfometria (n= 2.900 células) dos hepatócitos de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratados durante 28 dias com extrato seco de maracujá (*Passiflora incarnata*) veiculado na dieta nas doses 0, 50, 100 e 200 mg/Kg biomassa. Morfometria expressa em μm^2 .

Tratamento	Número de células	Citoplasma
Basal	187 $\pm$ 19 ^a	161,82 $\pm$ 44,08 ^e
0	158 $\pm$ 15 ^b	181,56 $\pm$ 41,32 ^d
50	139 $\pm$ 20 ^c	245,77 $\pm$ 57,05 ^c
100	124 $\pm$ 19 ^d	287,47 $\pm$ 78,27 ^a
200	141 $\pm$ 16 ^c	257,65 $\pm$ 57,79 ^b

* Médias com letras minúsculas, sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Verificou-se que a adição do extrato nas diferentes doses provocou aumento crescente e significativo da área citoplasmática, com destaque para o tratamento com 100 mg/Kg. De acordo com Takashima e Hibiya, (1995) este aumento pode decorrer do acúmulo de substratos energéticos como lipídios e glicogênio ou, segundo Rodrigues e Fanta (1998), da combinação de substâncias tóxicas com lipídios intracitoplasmáticos.

As células hepáticas armazenam grandes quantidades de glicogênio e processam lipídeos quando indivíduo está em bom estado nutricional (SÁ, 1998). No presente trabalho pode-se constatar, por meio da prova da amilase salivar (Figura 7), que o aumento da área citoplasmática decorreu de um acúmulo significativo de glicogênio e não de lipídeo, podendo-se então sugerir que a administração do extrato não prejudicou o estado nutricional dos peixes.

A quantidade de glicogênio hepático armazenado pode estar relacionada ao sexo dos animais, como destacado por Quabius et al. (1998) que registraram uma redução mais pronunciada em indivíduos do sexo masculino após intoxicação provocada por um poluente ambiental. Porém no presente trabalho as diferenças observadas não podem ser atribuídas a esta variável uma vez que os animais utilizados eram todos machos obtidos por reversão, fato comprovado ao final do experimento pela observação das gônadas.

Outra variável que poderia explicar as variações da concentração de glicogênio hepático seria o tamanho dos peixes que, de acordo Tung e Shiau (1993), interfere na capacidade de utilização dos carboidratos. Porém, como destacado anteriormente, os animais apresentavam pesos iniciais semelhantes e seu desempenho não variou em função dos tratamentos empregados.

Segundo Cicik e Engin (2005) a fome pode reduzir os níveis de glicogênio hepático que são utilizados como fonte emergencial de energia em situações estressantes, o que seria esperado após o período de 15 horas de jejum estabelecido neste experimento antes das coletas. Embora o menor acúmulo de glicogênio hepático tenha ocorrido no grupo controle, fato que corrobora com a idéia dos efeitos do jejum sobre este parâmetro avaliado, observou-se que nos demais peixes, também submetidos ao mesmo período de jejum, as reservas mantiveram-se em níveis significativamente superiores, principalmente entre os peixes tratados com 100 mg/Kg do extrato.

Figura 7 Imagens histológicas (aumento 400X) do tecido hepático de juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, submetidos a tratamento (28 dias) com diferentes doses de extrato seco de maracujá, *Passiflora incarnata*, veiculado na dieta. À esquerda coloração em PAS evidenciando acúmulo de glicogênio, confirmado pela prova da amilase, à direita. Observar, à esquerda, a intensificação da coloração em função do aumento das doses do extrato (0 a 100 mg/Kg).

O acúmulo diferencial do glicogênio hepático não pode ser relacionado à ingestão diferencial de alimento entre os peixes, e mesmo à presença de açúcares no extrato, questões já discutidas anteriormente, poderia ser a causa de tal elevação, pois os peixes que receberam a maior dose (200 mg/Kg) e, portanto, maiores doses dos açúcares redutores presentes nesta amostra, não apresentaram as maiores áreas citoplasmáticas, como seria esperado. Além disso, peixes do grupo controle também apresentaram aumento significativo da glicemia no final do experimento, embora os valores registrados para a área citoplasmática tenham sido significativamente inferiores aos demais peixes, sugerindo-se então que tenha ocorrido mobilização de reservas de glicogênio de modo diferencial neste grupo que não foi submetido ao tratamento com o extrato.

Os hepatócitos dos peixes estão envolvidos no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos (ROBERTS, 1989), atividade controlada por uma variedade de hormônios como as catecolaminas e os corticosteroides que participam da resposta primária do estresse nos peixes (DONALDSON, 1981; ROBERTS, 1989; BOOM et al. 1991, VIJAYAN e MOON, 1992). De acordo com Dalmo et al. (1997) o estresse pode provocar alterações bioquímicas que resultam em danos celulares que são detectados por meio de exames histológicos nos peixes. Assim, alterações teciduais hepáticas como depleção do glicogênio podem ser utilizadas para avaliar o “nível” de estresse nas condições de criação (WEDEMEYER, 1996).

Santos et al. (2004) observaram em tilápias do Nilo, provenientes de ambiente poluído, alterações hepáticas condizentes com redução da concentração de glicogênio. Vijayan et al. (1990), Vijayan e Moon (1992) e Paxton et al. (1994) demonstraram que a quantidade deste substrato nos hepatócitos dos peixes é reduzida pela exposição a um agente estressor, em decorrência da ativação de enzimas glicolíticas via catecolaminas.

A depleção dos estoques de glicogênio hepático, segundo Russell et al. (2001), é uma condição negativa observada em peixes após estresse ambiental provocado pela contaminação da água com poluentes. Embora os efeitos do agente estressor empregado no presente experimento (imagem refletida em espelho) não tenham sido

detectados pela análise dos padrões comportamentais e dos parâmetros bioquímicos sangüíneos, conforme discutido anteriormente, verificou-se que este procedimento provocou alterações metabólicas que colaboraram com a depleção dos estoques de glicogênio hepático.

Porém esse efeito parece ter sido revertido nos peixes que receberam a dieta contendo o extrato de maracujá que, por meio de um mecanismo não elucidado no presente trabalho, contribuiu para a manutenção ou aumento dos estoques de glicogênio hepático, fato comprovado pela presença de áreas citoplasmáticas significativamente maiores nesses animais.

4 CONCLUSÕES

A administração do extrato de maracujá na dieta não provoca anormalidades no tecido hepático de juvenis de tilápia do Nilo.

O extrato de maracujá veiculado na dieta na dose de 100 mg/kg, por meio de mecanismos não elucidados neste trabalho, protege a tilápia do Nilo da depleção dos estoques de glicogênio hepático causado pelo estresse social.

A análise histológica do tecido hepático representa mais uma ferramenta para avaliação dos efeitos do estresse social na espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M.M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.795 p.

ALI, A.; AL-OGAILY, S.M. AL-ASGAH, N.A.; GODDARD, J.S.; AHMED S. I. Effect of feeding different protein to energy (P/ E) ratios on the growth performance and body composition of *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, p.31-37, 2008.

ANDERSEN, D.E.; REID, S.D.; MOON, T.W.; PERRY, S.F. Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 48, p. 1811- 1817, 1991.

BACCARIN, A.N.; PEZZATO, L.E.; URBINATI, E.C. Efeito da alimentação com levedura desidratada de álcool na glicemia e nos níveis de glicogênio e lipídios totais hepáticos da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 26, n.2, p.163-167, 2000.

BARCELLOS, L.J.G.; NICOLAIEWSKY, S.; SOUZA, S.M.G.; LULHIER, F. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. **Aquaculture Research**, v. 30, p.437-444, 1999.

BARONE, A.A.C. Efeito do maracujá (*Passiflora incarnata* L. 1753) sobre o bem-estar da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L. 1759) Pirassununga-SP, 2006. 72p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo.

BARRETO, R.E.; VOLPATO G.L. Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.1605-1612, 2006.

BARTON, B.A. Stress in fish: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p. 517-525, 2002.

BARTON, B.A.; IWANA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 10, p.03-26 1991.

BENLI, A.C.K; YULDIS, H.Y. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Research*, v. 35, 1388-1390 doi:10.1111/j.1365-2109.2004.01158.x 2004.

BERGNER, P. Passionflower. **Medical Herbalism**, v.7, p. 13-14, 1995.

BISWAS AK, MAITA M, YOSHIZAKI G, TAKEUCHI T. Physiological responses in Nile tilapia exposed to different photoperiod regimes. **Journal of Fish Biology**, v.65 p.811-821, 2004.

BONGA, S.E.W. The stress response in fish. **Physiological Review**, v.77, p.591-625, 1997.

BOON, V.D.J.; THILLART, V.D.G.; ADDINK. A.D.F. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology (A)**, v.100, p.47-53, 1991.

BORGES, G.; MENDONÇA, P.; JOAQUIM, N.; COUCELO, J.; AURELIANO, M. Acute effects of vanadate oligomers on heart, kidney and liver histology in the lusitnian toadfish (*Halobatrachus didactylus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.45, p.415-422, 2003.

BRAGA, F. M. S. Estudo entre fator de condição e relação peso/comprimento para alguns peixes marinhos. **Revista Brasileira de Biologia**, v.46, p.339-46, 1986.

BRUSLÉ, J. ANADON, G.G. The structure and function of fish liver. In: **Fish morphology**. Science Publishers, p.77-93, 1996.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.75, n.3, p.501-512, 2003.

CARMICHAEL, G.J. Long distance truck transport of intensively reared largemouth bass. **Progressive Fish Culturist**, v.46, p.111-115, 1984.

CECH, J.J.; BORTHLOW, S.D.; YOUNG, P.S.; HOPKINS, T.E. Striped bass exercise and handling stress in freshwater: physiological response to recovery environment. **Transaction of the American Fisheries Society**, v.125, p. 308-320, 1996.

CHEN, C.; GREGORY, A.; WOOSTER, R. G.; GETCHELL, P.; BOWSERA, R. TIMMONS, B.M.B. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis **Aquaculture**, v. 218, p. 89-102, 2003.

CHEN, G.R.; SUN, L.T.; LEE, Y.H.; CHANG, C.F. Characteristics of blood in common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to low temperatures. **Journal of Applied Aquaculture**, v.5, p.21-31, 1995.

CHRISTIANSEN, D.C.; KLUNGSOYR, L. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology (B)**, v.88, p.701-711, 1987.

CHROUSOS, G.P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. **New York Academy of Sciences**, v.851, p.311-335, 1998.

CICIK, B.; ENGIN, K. The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio*(L.1758). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.29, p.113-117, 2005.

CODA, S. **Cultivo intensivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertida sexualmente em duas densidades de estocagem**. Londrina, 1996. 67 p. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual de Londrina – Paraná, 1996.

CORREA, S. A. **Respostas Fisiológicas e Comportamentais em Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidas ao Estresse Social**. Pirassununga-SP, 2001. 78p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo.

CORREA, S.A.; FERNANDES, M.O.; ISEKI, K.K.; NEGRAO, J.A. Effect of the establishment of dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.1725-1731, 2003.

COWEY, C.B. The nutrition of fish: the developing scene. **Nutrition Research Review**, v.1, p. 255-280, 1988.

DALMO, R.A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. Non-especific defence mechanisms in fish, with particular reference to the Reticuloendothelial System (RES). **Journal of Fish Diseases**, v.20, p. 241-273, 1997.

DAVIS, K.B.; TORRANCE, P.; PARKER, N.C.; SUTTLE, M.A. Growth, body composition, and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol-fed channel catfish, *Ictalurus punctatus* R. **Journal of Fish Biology**, 27, 177-184, 1985.

DE SILVA, S.S.; ANDERSON, T.A. **Fish nutrition in aquaculture**. London: Chapman & Hall, 1995.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMAR, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.1, p.1-23, 2004.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMAR, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.165-170, 2001(a).

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMAR, A. Comparative biological activity study on *P. incarnata* and *P. edulis*. **Fitoterapia**, v.72, p.698-702, 2001(b).

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMAR, A. Evaluation of central nervous system effects of *Passiflora incarnata* in experimental animals. **Pharmaceutical Biology**, v.41, n.2, p.87-91, 2003.

DONALDSON, E.M. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish in: PICKERING A.D. **Stress and Fish**, 1st. Ed. Academy Press New York, p.11-76, 1981.

DÓRIA, C.R.C.; LEONHARDT, J.L. Análise do crescimento de *Cyprinus carpio* (Pisces: Cyprinidae) em sistema de policultivo semi-intensivo com arraçoamento e adubação orgânica. **Unimar**, v.15, p.223-31, 1993.

EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIOUS, P.H. Effects of sublethal dissolved oxygen stress on blood glucose and susceptibility to *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.15, p. 202-208, 2003.

FERNANDES, M. O. **Estresse social, metabolismo e crescimento em peixes.** Botucatu-SP, 1997. 82p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A. M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. A.; MONTEIRO, R. A. F.; REIS-HENRIQUES, M. A.; ROCHA, M. A. A. Spatial relationships of the intrahepatic vascular–biliary tracts and associated pancreatic acini of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae): A serial section study by light microscopy. **Annals of Anatomy**, v.189, p.17-30, 2007.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A. M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. A.; MONTEIRO, R. A. F.; REIS-HENRIQUES, M. A.; ROCHA, M. A. A. Temperature and gender influence on the hepatic stroma (and associated pancreatic acini) of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae); A stereological analysis by light microscopy, **Journal of Morphology**, v. 267, p.221-223, 2006.

FURUICHI, M.; YONE, Y. Change of blood sugar and plasma insulin levels of fishes in glucose tolerance test. **Bulletin of Japanese Society of Science Fish**, v.47, p. 761-764, 1981.

GARCIA-RIERA, M.P.; HEMRE, G.I. Glucose tolerance in turbot, *Scophthalmus maximus* L. . **Aquaculture Nutrition**, v.2, p.117-120, 1996.

GRICE, I.D.; FERREIRA, L.A.; GRIFFITHS, L.R. Identification and simultaneous analysis of harmaline, harmine, harmol, isovitexin and vitexin in *Passiflora incarnata* extracts with a novel HPLC method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.24, n.16, 2513-2523, 2001.

GROFF, J.M.; ZINKL, J.G. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish. **Veterinary Clinics North American: Exotic Animal Practice**, v.2, p.741-776, 1999.

HARMON, J.S.; EILERTSON, C.D.; SHERIDAN, M.A.; PLISETSKAYA, E.M. Insulin suppression is associated with hypersomatostatinemia and hyperglucagonemia in glucose-injected rainbow trout. **American Journal of Physiology**, v.261, p.609-613, 1991.

HEATH, A.: **Water pollution and fish physiology.** CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. 1995. 385p.

HICKEY, M.; KING, C. **100 Families of Flowering Plants**. Cambridge University Press, Cambridge, p.130-133, 1988.

HUNG, S.S.O. Carbohydrate utilization by white sturgeon as assessed by oral administration tests. **Journal of Nutrition**, v.121, p.1600-1605, 1991.

HRUBEC, T.C.; CARDINATE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 29, p.7-12, 2000.

HUSSEIN, S.Y.; EL-NASSER, M.A.; AHMED, S.M. Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut Egypt. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.57 p.503-510, 1996.

IWANA, G.K. Stress in fish. **Annals of the New York Academy of Science**, v.851, p. 304-310, 1997.

KOEBELE, B. P. Growth and the size hierarchy effect: in the experimental assessment of three proposed mechanisms; activity differences disproportional food acquisition, physiological stress. **Environmental Biology Fish**, v. 12, n. 3, p. 181-188, 1985.

KROGDAHL, A.; HEMRE, G.I. MOMMSEN, T.P. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in post larval stages. **Aquaculture Nutrition**, v.11, p.103-122, 2005.

KUBOKAWA, K.; WAANABE, T.; YOSHIOKA, M.; IWATA, M. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. **Aquaculture**, v.172, p.335-349, 1999.

LAIDLEY, C.W.; LEATHERLAND, J.F. Cohort sampling, anaesthesia and stocking density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* R. **Journal of Fish Biology**, v.33, p.73-88, 1988.

LEACH, G.J.; TAYLOR, M.H. The effects of cortisol treatment on carbohydrate and protein metabolism in *Fundulus heteroclitus*. **General and Comparative Endocrinology**, v.48, p.76-83, 1982.

LEONHARDT, J.H.; URBINATI, E.C. Estudo comparativo do crescimento entre machos de tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*, sexados e revertidos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.25, p.19-26, 1999.

LI, H.W.; BROCKSEN, R.W. Approaches to the analysis of energetic costs of intraspecific competition for space by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Fish Biology**, v.11, p.329-334, 1977.

MAUEL, M.J.; DEBRA L. MILLER, D.L; MERRILL, A.L. Hematologic and plasma biochemical values of healthy hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* _ *Oreochromis nilotica*) maintained in a recirculating system. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.38, n.3, p. 420-424, 2007.

MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F. Adrenergic response to stress in fish. In: PICKERING, A.D. **Stress in fish**. London: London Academic, 1981, p.49-75.

McLEAY, D. J. Development of a blood glucose sugar bioassay for rapidly measuring stressful levels of pulpmill effluent to salmonid fish. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v.34, p.477-485, 1977.

MILES, H. M.; LOEHNER, S. M; MICHAUD, D. T.; SALIVAR, S. L. Physiological responses of hatchery reared muskellunge (*Esox masquinongy*) to handling. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.103, p.336-342, 1974.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31(3), p.426-428, 1959

MOBERG, G.P. Influence of stress on reproduction: measure of well-being in animal stress. **American Physiology Society**, p.245-267, 1985.

NEGRAES, P.; FRANCO. L.; KRÖKER E.A.P.; SANTOS, F.M. **Guia de Plantas Medicinais e Aromáticas (2003)**. Disponível em <http://boxer.ciagri.usp.br/pm/ver_1pl.asp> Acesso em 25/09/2003.

NOAKES, D.L.G.; LEATHERLAND, J.F. social dominance and interregional cell activity in rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Pisces: Salmonidae). **Environmental Biology of Fishes**, v.2, p.131-136, 1977.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of domestic animals:** Nutrient Requirements of Coldwater Fishes. National Academy Press, Washington, DC, v. 16 p. 63, 1981

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of domestic animals:** Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfish, revised. National Academy Press, Washington, DC, p. 102, 1983

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Effect of short-term crowding stress on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. **Fish and Shellfish Immunology**, v.11, p.187-197, 2001.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata* L.) **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.84, p.17-27, 2002.

PAXTON, R.; GIST, D.H.; UMMINGER, B.L.; Serum cortisol levels in thermally-acclimated gold fish (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbances. **Journal of Fish Research Board Canada**, v. 24, p.1710-1715, 1994.

PEETERS, E.; DRIESSEN, B.; STEEGMANS, R.; HENOT, D.; GEERS, R. Effect of supplemental tryptophan, vitamin E, and a herbal product on responses by pigs to vibration. **Journal of Animal Science**, v.82, p.2410-2420, 2004.

PETERS, G.; DELVENTHAL, H.; KLINGER, H. Physiological and morphological effects of social stress in the eel (*Anguilla anguilla* L.). **Arch Fischwiss**, v.30, p.157-180, 1980.

PETERS, G.; DELVENTHAL, H.; KLINGER, H. Aquaculture in Heated Effluents and recirculation systems in: WEDEMEYER, G.A. **Physiology of fish in intensive culture Systems**. New York, Chapman & Hall, 1996, v.2, p.239-248

PETERS, G.; SCHWARZER, R. Changes in hematopoietic tissue of rainbow trout under influence of stress. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.4, p.83-89, 1985.

PICKERING, A.D. Introduction: The concept of biological stress. In: Pickering, A.D. (ed) **Stress and Fish**. Academic Press, London, p.1-9, 1981.

PICKERING, A.D. Grow and stress in fish production. **Aquaculture**, v.111, p.51-63, 1993.

PICKERING, A.D.; Christie, P. Changes in the concentrations of plasma cortisol and thiroxyne during sexual maturation of the hatchery-reared brown trout, *Salmo trutta* L. **General and Comparative Endocrinology**, v.44, p.487-496, 1981.

QUABIUS, E.S.; NOLAN, D.; BALM, P.H.M.; SJOERD E. WENDELAAR BONGA. The influence of polychlorinated biphenyl 126 on tilapia (*Oreochromis mossambicus*) liver. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v.120, p.57-63, 1998.

REDDY, P.K.; LEATHERLAND, J.F. Stress Physiology. In: LEATHERLAND, J.F.; WOO, P.T.K. **Fish diseases and disorders, v.2. Non-infections disorders**. New York: CABI Publishing, p.279- 301, 1998.

REDDY, P.K.; VIJAYAN, M.M.; LEATHERLAND, J.F.; MOON, T.W. Does RU486 modify hormonal responses to handling stressor and cortisol treatment in fed and fasted rainbow trout? **Journal of Fish Biology**, v.46, 341-359, 1995.

RENDLE, A.B. **Classification of Flowering Plants**. Cambridge University press, Cambridge, p. 211-213, 1959.

REUBUSH, K.J.; HEATH, A.G. Metabolic response to acute handling by fingerling inland and anadromous striped bass. **Journal of Fish Biology**, v.49, p.830-841, 1996.

ROBERTS, R.J. **Fish Pathology**. 2nd. ed. Baillière Tindall, New York, 1989.

RODRIGUES, E.L.; FANTA, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sub lethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. **Revista brasileira de Zoologia**, v.15, n.2, p.441-450, 1998.

ROTLLAND J.; TORT, T. Cortisol and glucose response after acute stress by handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. **Journal of Fish Biology**, v. 51, p.21-28, 1997.

RUSSEL, P.M.; DAVIES, S.J.; GOUVEIA, A.; TEKINAY, A.A. Influence of dietary starch source on liver morphology in juvenile cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture Research**, v.32, n.1, p.306-314, 2001.

SÁ, O.R. **Toxicidade do herbicida Roundup (Glifosato) e do acaricida Omite (Propargito) nas fases iniciais da ontogenia do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes)**. São Carlos – SP, 1998. 307p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos.

SANTOS, A.A.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FELIZARDO, N.N.; RODRIGUES, E.L. Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, n.2, p.141-145, 2004.

SHERIDAN, M. Effects of thyroxine, cortisol, growth hormone and prolactin on lipid metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. **General and Comparative Endocrinology**, v.64, p.220-238, 1986.

SHIKATA, T.; IWANAGA, S.; SHIMENO, S. Effects of dietary glucose, fructose and galactose on hepatopancreatic enzyme activities and body composition in carp. **Fisheries Science**, v.60, p.613-617, 1994.

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

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.;BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioral effects of *P. incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, p.11-20, 1997.

SPERONI, E.; BILLI, R.; MERCATI, V.; BONCOMPAGNI, E.; TOJA, E. Sedative effects of crude extract of *Passiflora incarnata* after oral administration. **Phytotherapy Research**, v.10, p.92-94, 1996(a).

SPERONI, E.; BILLI, R.; PERELLINO, N.C.; MINGHETTI, A. Role of chrysin in the sedative effects of *P. incarnata* L. **Phytotherapy Research**, v.10, p.98-100, 1996(b).

SPERONI, E. MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extract from *P. incarnata*. **Planta Médica**, v.54, p.488-491, 1998.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2. ed. Tokyo: Kodansha Stuttgart: Fischer Verlag. 195p. 1995.

TAYLOR, L. **Maracuja, Herbal Secrets of the Rainforest**. Prime Publishing Inc., Austin, TX. 1986, 360p.

THOMAS, P.; ROBERTSON, L. Plasma cortisol and glucose stress response of red drum (*Sciaenops ocellatus*) in handling and shallow water stressors and anesthesia with MS 222, quinaldine sulfate, and metomidate. **Aquaculture**, v.96, p.68-86, 1991.

TUNG, P.H.; SHIAU, S.Y. Carbohydrate utilization versus body size in tilapia, *Oreochromis niloticus* _ *O. aureus*. Comparative **Biochemistry Physiology**, v.104, p.585-588, 1993.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, p.289-306, 2006.

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996. 169 p.

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

VIJAYAN, M.M; BALLANTYNE, J.S.; LEATHERLAND, J.F. High stocks density alters the energy metabolism of brood charr, *Salvelinus fontinalis*. **Aquaculture**, v.88, p. 371-381, 1990.

VIJAYAN, M.M.; LEATHERLAND, J.F. Effect of stocking density on the growth and stress response in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. **Aqualculture**, 75, 159-170, 1988.

VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food deprived rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Canadian Journal of aquatic science**, v.49, p.2260-2266, 1992.

VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, M.C.; MOON, T.W. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. **Comparative Biochemistry and Physiology (C)**, v.108, p.321-329, 1994(a).

VIJAYAN, M.M.; REDDY, P.K.; LEATHERLAND, J.F.; MOON, T.W. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout. A study using the steroid analog RU486. **General and Comparative Endocrinology**, v.96, p.75-84, 1994(b).

VINATEA, L. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura**. 2 ed. revisada e ampliada. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 345 p.

VOLPATO, G.L.; BARRETO, R.E. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.1041-1045, 2001.

VOLPATO, G.L.; FRIOLI, P.M.A.; CARRIERI, M.P. Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and a general view about the causal mechanisms. **Boletim of Physiology Animal**, v.13, p.7-22, 1989.

VOLPATO, G.L.; LUCHIARI, A.C.; DUARTE, C. R. A.; BARRETO, R.E.; RAMANZINI, G.C. Eye color as na indicator os social rank in the fish Nile tilapia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.12, p.1659-1663, 2003.

WEDEMEYER, G.A. **Physiology of fish in intensive culture Systems**. New York, Chapman & Hall, 1996, 232p.

WEDEMEYER, G.A.; BARTON, B.A.; MCLEAY, D.J. Stress and acclimation. In: Schreck, C.B. and Moyle, P.B. (eds) **Methods for Fish Biology**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, p.451-489, 1990.

WENDELAAR-BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiology Review**, v.77, p.591-625, 1997.

WILSON, R.P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture** v.124, p. 67– 80, 1994.

WINBERG, S.; NILSSON, G.E. Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behavior and stress reactions, with particular reference to fish. **Comparative Biochemistry and Physiology (C)**, v.106 n.3, p.597-614, 1993.

WIRTZ, P.; DAVENPORT, J. Increase oxygen consumption in blennies (*Blennius pholis* L.) exposed to their mirror images. **Journal of Fish Biology**, v.9, n.1, p.67-74, 1976.

YAMAGISHI, H. Growth relation in some small experimental populations of rainbow trout fry, *Salmo gairdneri* R. with special reference to social relations among individuals. **Japanese Journal of Ecology**, v.12, p.43-53, 1962.

ANEXOS

ANEXO A - Boletim de análise do extrato seco de *Passiflora Incarnata*

**GRUPO
CENTROFLORA**

Parcerias para um mundo melhor.

Boletim de Análise

Código: 21130		Produto: PASSIFLORA INCARNATA EXTRATO SECO 3,5	
Parte Usada: FOLHAS		Nome Científico: <i>Passiflora incarnata</i> L.	
Método de Produção: SPRAY DRYER		Lote: 0208041129	
Solvente p/ Extração: ETANOL/ÁGUA			
Análise	Especificações	Resultados	Métodos
Aspecto	PÓ FINO E	PÓ FINO E	VISUAL
	HIGROSCÓPICO	HIGROSCÓPICO	
Cor	PARDO ESVERDEADO	PARDO ESVERDEADO	VISUAL
Sabor/Odor	CARACTERÍSTICOS	CARACTERÍSTICOS	—
Umidade	MAX 8,0%	4,42%	2g/105°C/2h (DFQ-M-35)
pH direto Sol.10%	5,0 +/-1,0	5,02	PHMETRO MARCONI(SOL. 10%)
Solubilidade	PARCIALMENTE SOLÚVEL	PARCIALMENTE SOLÚVEL	VISUAL (SOL. 10%)
	OU SOLÚVEL EM ÁGUA	EM ÁGUA	
Fluidez Volumétrica	350 - 650 g/l	640g/l	QO-037
Doseam./Identif.	FLAVONÓIDES TOTAIS		
	CALCULADOS COMO	3,67%	FARMACOPÉIA EUROPEIA IV
	VITEXINA 3,5% - 3.9%		
Teor Alcoólico	NA	NA	NA
Índice de Refr.	NA	NA	NA
Densidade	NA	NA	NA
Resíduo Seco	NA	NA	NA

Fabr.: 09/2004

Valid.: 09/2007

Obs: SETEMBRO/2004

NA=NÃO APLICÁVEL

ESPECIFICAÇÃO EXPERIMENTAL

SAC - SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE

FONE: (14) 3811-3530

Rod.Eduardo Zuccari, Km 21,5 - s/n - Botucatu - SP - Brasil

CEP 18603-970 - Cx Postal 254

E-mail: sac@centroflora.com.br - Site: www.centroflora.com.br

GCQ - 016 - a - 11/03 - Prescrição: Indeterminado

Reinaldo Aparecido de Souza
CRF: 24284-SP

ANEXO B - Boletim microbiológico do extrato seco de *Passiflora Incarnata* **Boletim Microbiológico**

Código: 21130

Produto: PASSIFLORA INCARNATA EXTRATO SECO 3

Nome Científico:

Lote: 0208041129

Análise	Especificações	Resultados	Métodos
Bactérias Totais	MENOS DE 1000 UFC/g	<10 UFC/g	QO-108
Fungos e Leveduras	MENOS DE 100 UFC/g	<10 UFC/g	QO-108
Gram negativos	AUSENTES	AUSENTES	QO-108
Escherichia coli	AUSENTE	AUSENTE	QO-109
Staphylococcus aureus	AUSENTE	AUSENTE	QO-109
Pseudomonas aeruginosa	AUSENTE	AUSENTE	QO-109
Salmonella sp	AUSENTE	AUSENTE	QO-109

Obs:

SETEMBRO/2004

SAC - SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE

FONE: (14) 3811-3530

Rod. Eduardo Zuccato, Km 21,5 - s/n - Botucatu - SP - Brasil

CEP 18603-970 - CX. Postal 254

E-mail: sac@centroflora.com.br - Site: www.centroflora.com.br

Reinaldo Aparecido de Souza
 CRF: 24284-SP

GCQ - 016 - Prescrição: Indeterminado

ANEXO C - Especificações do extrato seco de *Passiflora Incarnata*

**GRUPO
CENTROFLORA**

Parcerias para um mundo melhor.

ESPECIFICAÇÃO

Versão 05

Data: 11/2004

PRODUTO: PASSIFLORA INCARNATA EXTRATO SECO 3,5%

NOME CIENTÍFICO: *Passiflora incarnata* Linné

SOLVENTE DE EXTRAÇÃO: Água/Etanol

PROCESSO DE PRODUÇÃO: SPRAY-DRYER

PAÍS DE ORIGEM: *Passiflora incarnata* – folhas – Europa

PAÍS PRODUTOR: Brasil

EXCIPIENTES UTILIZADOS: Dextrina – CCP – Brasil

RATIO: 4 – 6:1

PARTE USADA: FOLHAS

CÓDIGO: 21130 (Antigo.: DS1243)

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Aspecto	Pó fino higroscópico
Cor	Pardo esverdeado
Odor/Sabor	Característicos
Umidade	Máx. 8%
Solubilidade	Parcialmente solúvel ou solúvel em água
pH direto Sol. 1%	5,0 +/- 1,0
Fluidez Volumétrica	350 – 650 g/L
Doseamento	Flavonóides totais calculados como Vitexina: 3,5% - 3,9%
MICROBIOLOGIA	
Bactérias Totais	< 1000 UFC/g
Fungos e Leveduras	< 100 UFC/g
Gram negativos	Ausentes
Pseudomonas aeruginosa	Ausente
Escherichia coli	Ausente
Salmonella sp	Ausente
Staphylococcus aureus	Ausente

ESTOCAGEM E VALIDADE

O produto deve ser armazenado em uma área seca sem extremos de temperatura (calor ou frio). Embalagens abertas devem ser fechadas imediatamente. O tempo de validade para embalagens não abertas é de 3 anos.

EMBALAGEM

Barrica contendo 25 kg.

NOVEMBRO/2004.

Comercial: Al. Tocantins, 75 – 2º Andar – Cj. 206 – Alphaville – Barueri/SP – Cep: 06455-020

Fone: (11) 4193-2260 – Fax: (11) 4193-1166

Matriz: Av. Mário Sartor, 77 – C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3500 – Fax: (14) 3815-3771

Filial: Rod. Eduardo Zuccari, km 21,5 s/nº – C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3520 – Fax: (14) 3813-3877

Visite nossas homepages: www.centroflora.com.br e www.anidro.com.br

Serviço de Atendimento ao Consumidor: Fone (14) 3811-3530 ou sac@anidro.com.br

**GRUPO
CENTROFLORA**

Purcerias para um mundo melhor.

MSDS #1642/PORT

Abril, 2004.

Pag. 1 de 5

**MATERIAL SAFETY DATA SHEET
GRUPO CENTROFLORA / ANIDRO**

1. PRODUTO E IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA.

NOME DO PRODUTO	PASSIFLORA INCARNATA EXTRATO SECO 3,5%
CÓDIGO DO PRODUTO	21130 (Antigo.: DS1243)
FAMÍLIA QUÍMICA	Não aplicável
NOME QUÍMICO	<i>Passiflora incarnata</i> Linné
FÓRMULA	Não aplicável
PRODUTOR :	NÚMEROS DE TELEFONE DE EMERGÊNCIA:
GRUPO CENTROFLORA	Transporte: 55-14-3811-3520
Rod. Eduardo Zuccari, Km20,5	55-11-4193-2260
Botucatu - São Paulo	
CEP.18609-970	
Fone:55-14-3811-3520	Sem transporte: 55-14-3811-3520
	55-11-4193-2260

2. COMPOSIÇÃO/ INFORMAÇÃO DE INGREDIENTES

Passiflora incarnata folhas; dextrina CCP – Brasil.

3. INGREDIENTES PERIGOSOS

Nenhum presente. Como este material não é classificado como perigoso sob as regulamentações da OSHA, este MSDS com informação crítica valiosa para o manuseio seguro e o uso apropriado deste produto. Este MSDS deve ser retido e disponível para empregados ou outros usuários deste produto.

EMERGÊNCIA

Nenhum material perigoso presente.

O material é um pó fino higroscópico, pardo esverdeado, com sabor e odor característicos.

EFEITOS POTENCIAIS À SAÚDE.

INALACÇÃO : Não determinado.

CONTATO COM A PELE: Não determinado

CONTATO COM OS OLHOS : Não determinado

EFEITOS POTENCIAIS AO MEIO AMBIENTE .

Nenhum conhecido.

Veja **INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA** (Seção 11).

Comercial: Al. Tocantins, 75 – 2º Andar – Cj. 206 – Alphaville – Barueri/SP – Cep: 06455-020

Fone: (11) 4193-2260 – Fax: (11) 4193-1166

Matriz: Av. Mário Sartor, 77 – C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3500 – Fax: (14) 3815-3771

Filial: Rod. Eduardo Zuccari, km 21,5 s/nº - C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3520 – Fax: (14) 3813-3877

Visite nossas homepages: www.centroflora.com.br e www.anidro.com.br

Serviço de Atendimento ao Consumidor: Fone (14) 3811-3530 ou sac@anidro.com.br

**GRUPO
CENTROFLORA**

Parcerias para um mundo melhor.

Pag 2 de 5

4. MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS

OLHOS: Remova lentes de contato. Lave imediatamente os olhos com água em abundância. Procure orientação médica, se a irritação persistir.

PELE: Lave as áreas afetadas com água em abundância.

INALAÇÃO: Nenhum tratamento específico é necessário, desde que este material não é considerado perigoso por inalação. Se exposto a níveis excessivos de poeira e fumaça, remova para o ar fresco e procure atenção médica, se tosse ou outros sintomas se desenvolverem.

INGESTÃO: Lave a boca e a garganta abundantemente com água. Não induza ao vômito. Procure atenção médica, se necessário.

5. MEDIDAS DE COMBATE AO FOGO

FLASH POINT: Substância não reativa.

MEIO DE EXTINÇÃO: Água, Pó Químico; Dióxido de Carbono; Espuma.

PROCEDIMENTOS ESPECIAIS DE COMBATE AO FOGO: Nenhum conhecido.

6. MEDIDAS DE DERRAMAMENTO ACIDENTAL:

PROCEDIMENTOS PARA VAZAMENTOS OU DERRAMAMENTO: Se um volume muito grande for derramado, use máscara durante a limpeza e disponha o material para minimizar a inalação de pós em suspensão. Este produto é considerado como um resíduo não perigoso quando derramado ou disposto, como o definido nas regulamentações do Ato de Recuperação e Conservação de Recursos (RCRA) (40 CFR261).

7. MANUSEIO E ESTOQUE.

TEMPERATURA ESTOQUE (MIN./MAX): 15 °C (59° F) / 40 °C (104° F)

TEMPO DE PRATELEIRA: 3 anos no contêiner original selado.

SENSIBILIDADE ESPECIAL: Calor e umidade.

PRECAUÇÕES DE MANUSEIO E ESTOCAGEM: Mantenha o contêiner fechado. Estoque em uma área limpa e seca sem extremos de calor ou frio, em temperaturas inferiores a 40° C (104° F).

8. CONTROLE DE EXPOSIÇÃO/ PROTEÇÃO PESSOAL.

REQUERIMENTOS DE PROTEÇÃO DOS OLHOS: Nenhum normalmente requerido.

REQUERIMENTOS PARA A PROTEÇÃO DA PELE: Apropriados às condições de uso.

RESPIRAÇÃO/ REQUERIMENTOS VENTILAÇÃO: O material é estável e não produz vapores, entretanto, se quantidades muito grandes de produto estiverem presentes, use respiradores ou máscaras adequadas.

Comercial: Al. Tocantins, 75 – 2º Andar – Cj. 206 – Alphaville – Barueri/SP – Cep: 06455-020

Fone: (11) 4193-2260 – Fax: (11) 4193-1166

Matriz: Av. Mário Sartor, 77 – C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3500 – Fax: (14) 3815-3771

Filial: Rod. Eduardo Zuccari, km 21,5 s/nº - C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3520 – Fax: (14) 3813-3877

Visite nossas homepages: www.centroflora.com.br e www.anidro.com.br

Serviço de Atendimento ao Consumidor: Fone (14) 3811-3530 ou sac@anidro.com.br

**GRUPO
CENTROFLORA**

Purcias para um mundo melhor.

Pág 3 de 5

LIMITES DE EXPOSIÇÃO : Não estabelecido.

9. PROPRIEDADES FÍSICO - QUÍMICAS.

FORMA FÍSICA :	Pó fino higroscópico.
COR :	Pardo esverdeado
ODOR :	Característico.
PONTO DE EBULIÇÃO :	Não determinado.
PONTO DE FUSÃO/ PONTO DE CONGELAMENTO :	Não determinado.
SOLUBILIDADE EM ÁGUA :	Parcialmente solúvel ou solúvel em água
FLASH POINT :	Não aplicável
% VOLÁTEIS POR PESO :	Não determinado.
DENSIDADE DE VAPOR :	Não aplicável.

10. REATIVIDADE :

ESTABILIDADE :	Este é um material estável.
POLIMERIZAÇÃO PERIGOSA :	Não ocorrerá.
INCOMPATIBILIDADES :	Nenhuma conhecida.
PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO :	Nenhum conhecido.
CONTRAINDICAÇÕES :	Não conhecidas.

11. INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA :

INALAÇÃO AGUDA	Não determinado.
INALAÇÃO CRÔNICA :	Não determinado.
CONTATO AGUDO COM A PELE :	Não determinado.
CONTATO CRÔNICO COM A PELE :	Não determinado.
CONTATO AGUDO COM OS OLHOS :	Não determinado.

Comercial: Al. Tocantins, 75 – 2º Andar – Cj. 206 – Alphaville – Barueri/SP – Cep: 06455-020

Fone: (11) 4193-2260 – Fax: (11) 4193-1166

Matriz: Av. Mário Sartor, 77 – C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3500 – Fax: (14) 3815-3771

Filial: Rod. Eduardo Zuccari, km 21,5 s/nº - C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3520 – Fax: (14) 3813-3877

Visite nossas homepages: www.centroflora.com.br e www.anidro.com.br

Serviço de Atendimento ao Consumidor: Fone (14) 3811-3530 ou sac@anidro.com.br

**GRUPO
CENTROFLORA**
Parcerias para um mundo melhor.

Pág 4 de 5

INGESTÃO : Não determinado

LD 50 : Produto natural – ainda não testado

12. INFORMAÇÃO ECOLÓGICA :

DEGRADAÇÃO : Totalmente biodegradável – Produto Natural.

TOXICIDADE AQUÁTICA : Nenhum dado disponível.

13. CONSIDERAÇÕES DE DISPOSIÇÃO:

A disposição do produto deve ser feita de acordo com as práticas existentes. Consulte as regulamentações ambientais Local, Estadual e Federal.

Se for necessário dispor este produto, o mesmo não se enquadra no critério de resíduo perigoso como o definido no Ato de Recuperação e Conservação de Recursos (RCRA) 40 CFR 261.

14. INFORMAÇÃO DE TRANSPORTE :

DOT informação :

NOME ADEQUADO DE EMBARQUE : Não regulamentado.

NOME TÉCNICO DE EMBARQUE : PASSIFLORA INCARNATA EXTRATO SECO 3,5%

CLASSE DE PERIGO : Nenhum

UN NÚMERO : Nenhum.

PRODUTO RQ (lbs.): Nenhum.

RÓTULO : Nenhum.

CARTAZ : Nenhum

TIPO /VOLUME DO FRETE : m3

TIPO EMBALAGEM FRETE: Fibra

RÓTULO DO PRODUTO : PASSIFLORA INCARNATA EXTRATO SECO 3,5%

15. INFORMAÇÃO REGULATÓRIA :

TSCA STATUS : Não aplicável

CERCLA QUANTIDADE REPORTÁVEL :

SARA TÍTULO III:

SECÇÃO 302 SUBSTÂNCIAS TREMENDAMENTE

PERIGOSAS Nenhum.

SECÇÃO 311/312

CATEGORIAS PERIGOSAS Nenhuma.

Saúde/ Aguda Não

Comercial: Al. Tocantins, 75 – 2º Andar – Cj. 206 – Alphaville – Barueri/SP – Cep: 06455-020

Fone: (11) 4193-2260 – Fax: (11) 4193-1166

Matriz: Av. Mário Sartor, 77 – C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3500 – Fax: (14) 3815-3771

Filial: Rod. Eduardo Zuccari, km 21,5 s/nº - C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3520 – Fax: (14) 3813-3877

Visite nossas homepages: www.centroflora.com.br e www.anidro.com.br

Serviço de Atendimento ao Consumidor: Fone (14) 3811-3530 ou sac@anidro.com.br

**GRUPO
CENTROFLORA**

Parcerias para um mundo melhor.

Pág 5 de 5

Saúde/ Crônica Não.
Fogo Não.
Reativo Não.
Liberação súbita de pressão Não.

SECTION 313

QUÍMICOS TÓXICOS

Nenhum.

RCRA STATUS :

Se o produto for descartado em sua forma adquirida, o mesmo não será um resíduo perigoso, por especificação nem por suas características. Entretanto, sob RCRA, é responsabilidade do usuário do produto determinar o tempo para disposição, quer seja um determinado material que contém o produto ou um derivado do produto, e assim deve ser classificado como resíduo perigoso (40 CFR 261, 20-24).

STATUS CANADENSE :

Sem restrições aplicáveis.

UNIÃO EUROPEIA :

Sem restrições aplicáveis.

INFORMAÇÃO REGULATÓRIA ESTADUAL : Não aplicável.

16. OUTRAS INFORMAÇÕES

Para maiores informações sobre o uso e segurança de extratos botânicos (como este) para propósitos medicinais, veja as referências seguintes :

McGuffin, M.; C. Hobbs; R. Upton; and A. Goldberg (eds.) 1997. The Botanical Safety Handbook. The American Herbal Products Association.

Brazilian Botanical Monographs . Nat-trop. www.nat-trop.com

RAZÃO PARA NOVA EMISSÃO Para novo produto.

PREPARADO POR : Célia.

APROVADO POR : Elizabeth Terán

TÍTULO: MSDS #1642/ PASSIFLORA INCARNATA EXTRATO SECO 3,5% /21130

DATA DE APROVAÇÃO : 13/04/2004

MSDS NÚMERO : #1642/PORT

Esta informação é fornecida sem garantia, expressa ou implicada, exceto que a mesma está de acordo com o melhor conhecimento do grupo CENTROFLORA/ ANIDRO. Os dados relatam apenas o material anexo específico designado. O GRUPO CENTROFLORA/ ANIDRO não assume responsabilidade legal para o uso ou auxílio sobre esses dados.

Comercial: Al. Tocantins, 75 – 2º Andar – Cj. 206 – Alphaville – Barueri/SP – Cep: 06455-020

Fone: (11) 4193-2260 – Fax: (11) 4193-1166

Matriz: Av. Mário Sartor, 77 – C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3500 – Fax: (14) 3815-3771

Filial: Rod. Eduardo Zuccari, km 21,5 s/nº - C.P.: 254 – Botucatu/SP

Fone: (14) 3811-3520 – Fax: (14) 3813-3877

Visite nossas homepages: www.centroflora.com.br e www.anidro.com.br

Serviço de Atendimento ao Consumidor: Fone (14) 3811-3530 ou sac@anidro.com.br