

O extrato de maracujá sobre a morfometria de hepatócitos da tilápia do Nilo

The passion fruit on hepatocytes morphometry of Nile tilapia

Ricardo Henrique Franco de Oliveira^{I,II} Elyara Maria Pereira-da-Silva^{II}
Rachel Santos Bueno^{II} Adriana Aparecida Cuel Barone^{II} (In Memoriam)

RESUMO

Avaliaram-se os efeitos do extrato de maracujá veiculado na dieta (0, 50, 100 e 200mg kg⁻¹) sobre o consumo de alimento, o ganho em peso e os níveis de glicose e cortisol plasmático de juvenis de tilápias do Nilo (87,0 ± 6,6g). Ao final do experimento (28 dias), os peixes foram eutanasiados para remoção do fígado, visando à avaliação da área citoplasmática, contagem de células e verificação dos estoques de glicogênio hepático. Os dados foram submetidos à ANOVA unidirecional, comparando-se as médias pelo Teste de Tukey (P<0,05), com posterior estudo de regressão, buscando estabelecer as curvas das áreas citoplasmáticas, em função das diferentes doses do extrato. A inclusão do extrato na dieta não afetou o consumo de alimento e o crescimento e todos os peixes apresentaram aumento da glicose e redução do cortisol plasmático, porém sem diferenças entre os tratamentos. As curvas de regressão indicaram aumento quadrático da área citoplasmática com a elevação da doses do extrato, principalmente para 100mg kg⁻¹, resultando em uma curva dose-resposta em forma de “U” invertido. O aumento da área do citoplasma decorreu de um acúmulo de glicogênio hepático, conforme comprovado pela prova da amilase salivar. Concluiu-se que o extrato de maracujá pode ser fornecido na dieta de juvenis de tilápia, sem prejudicar o consumo alimentar e o crescimento dos animais e que o produto altera a morfometria dos hepatócitos, sugerindo a atividade de flavonóides sobre o metabolismo de carboidratos.

Palavras-chave: carboidrato, fígado, histologia, *Oreochromis niloticus*, *Passiflora incarnata*.

ABSTRACT

The effects of passion fruit extract (0, 50, 100 and 200mg kg⁻¹) on food consumption, growth and glucose levels

and plasma cortisol were investigated in juvenile Nile tilapia (87.0 ± 6.6g). After 28 days, fish were killed and the liver was removed for study of cytoplasm area, cell count and verification of hepatic glycogen stores. The data were subjected to one-way ANOVA comparing the means by Tukey's test (P<0.05), with further study to establish the regression curves of cytoplasm areas related to different doses of the extract. The inclusion of the extract in the diet did not affect food consumption and growth, and all fish showed increased glucose and reduced plasma cortisol, without differences between treatments. The cytoplasm area increased quadratically as the doses increased, mainly for 100mg kg⁻¹, resulting in an inverted “U” dose-response curve. The increase of cytoplasm area resulted from hepatic glycogen storage, as confirmed by salivary amylase. It was concluded that passion fruit extract can be delivered in the diet of juvenile tilapia, without impairing of food consumption and growth, and that the product affects the hepatocytes morphometry, suggesting flavonoids activity on carbohydrate metabolism.

Key words: carbohydrates, histology, liver, *Oreochromis niloticus*, *Passiflora incarnata*.

INTRODUÇÃO

Peixes expostos às situações de estresse apresentam ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, resultando na liberação de corticosteróides (cortisol) e catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) que, em conjunto, mobilizam substratos energéticos, possibilitando as reações de luta ou fuga (SUMPTER, 1997).

^ICentro Universitário Anhanguera, Leme, 13614-370, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: ricohfo@usp.br. Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimento, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil.

A glicose é o principal monossacarídeo circulante que atua como substrato energético armazenado como glicogênio hepático e muscular (por meio da glicogênese), mobilizado para proporcionar suporte energético aos peixes. Sua concentração no sangue varia intra e interespecificamente, de acordo com o estágio de desenvolvimento e o regime de alimentação (WENDELAAR-BONGA, 1997; HEMRE et al., 2002).

Segundo DE SILVA & ANDERSON (1995), o metabolismo de glicogênio nos peixes difere dos demais vertebrados, pois, as necessidades de glicose são atendidas principalmente por meio da gliconeogênese (a partir de substratos como lactato, piruvato e aminoácidos) e não pela glicogenólise. As maiores reservas de glicogênio encontram-se no fígado e nos músculos dos peixes e são mobilizadas para atender às necessidades energéticas, que aumentam principalmente sob condições estressantes, seja no ambiente natural ou nas criações intensivas. No último caso, os peixes são expostos às altas densidades de estocagem e manejos constantes como seleção, captura e transporte (BARTON & IWAMA, 1991; VIJAYAN et al., 1994). ALBINATI et al. (2009), num estudo sobre toxicidade crônica do Roundap em piaçucus (*Leporinus macrocephalus*), observaram que os peixes expostos ao herbicida apresentaram depleção dos estoques de glicogênio hepático.

A quantidade de glicogênio armazenada no fígado e a capacidade de mobilização desta reserva de energia, nos períodos de jejum, variam entre os peixes (ENES et al., 2009). De acordo com HSIEH & SHIAU (2000), determinadas espécies preservam os estoques de glicogênio metabolizando quantidades significativas de lipídios, enquanto outras conservam parcialmente os estoques de glicogênio, metabolizando quantidade significativa de proteínas. Existem ainda as que conservam as proteínas e lipídios, utilizando parcialmente as reservas de glicogênio. Esses autores avaliaram as respostas fisiológicas de tilápias durante períodos de jejum e verificaram que os peixes alimentados previamente com dieta contendo glicose utilizaram, na primeira semana de jejum, reservas hepáticas de glicogênio e lipídio corporal.

Dentre as alternativas que visam melhorar o crescimento, aumentar a imunidade e reduzir os efeitos do estresse sobre os peixes destaca-se a utilização de plantas medicinais (KWOM et al., 1999; JUNG et al., 2002; SEUNG-CHEOL et al., 2007). O maracujá da espécie *Passiflora incarnata* apresenta potencial para redução do estresse e sua atividade está relacionada à presença de derivados pirônicos, alcalóides harmônicos e flavonóides, aos quais são atribuídos

efeitos sedativos e ansiolíticos (SOULIMANI et al., 1997; DHAWAN et al., 2003). Os flavonóides são polifenóis de baixo peso molecular e que apresentam atividade hipoglicêmica, atuando sobre a absorção da glicose, o metabolismo do glicogênio e a atividade de enzimas gliconeogênicas (HSU et al., 2003; JUNG et al., 2004; LIU et al., 2005).

Apesar dos efeitos benéficos do maracujá, nenhuma referência sobre sua atividade nos peixes é encontrada e as pesquisas restringem-se a modelos biológicos humanos ou demais mamíferos como ratos, camundongos e suínos (SPERONI & MINGHETTI, 1988; SOULIMANI et al., 1997; DHAWAN et al., 2003; PEETERS et al., 2004). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do extrato de maracujá, fornecido na dieta, sobre o consumo de alimento, o ganho em peso, parâmetros bioquímicos sanguíneos e a morfometria dos hepatócitos de tilápias do Nilo, oferecendo subsídios para estudos posteriores relacionados à viabilidade do emprego deste produto natural na redução dos efeitos do estresse da espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Um lote de 50 machos juvenis revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), provenientes de piscicultura comercial, foi estocado durante 30 dias em um tanque de 250L, sob temperatura de 27°C, fotoperíodo de 12 horas e alimentação (2% da biomassa) oferecida uma vez ao dia (ração comercial peletizada - 32% de proteína bruta). Após este período, os peixes foram anestesiados em 2-fenoxietanol (0,5mL L⁻¹) para seleção de 24 exemplares (87,0g ± 6,6g), que foram transferidos individualmente para unidades experimentais (aquários de 27L), onde permaneceram 15 dias sob isolamento químico e visual, para aclimação.

Após a aclimação, os peixes foram submetidos, durante 28 dias, a quatro tratamentos (n=6 peixes tratamento⁻¹), caracterizados pela inclusão de extrato seco comercial de folhas de *P. incarnata* (L.) (Grupo Centroflora/Anidro - 3,5-3,9% de flavonóides totais calculados como vitexina - Lote 02080411129), veiculado em alginato de sódio (Synth - Lote A108901 AS) pré-solubilizado em água destilada (0,5g 100 mL⁻¹), em quantidades necessárias para obtenção das doses de 50, 100 e 200mg kg⁻¹. Para o grupo controle, foi fornecida a ração isenta de extrato e contendo apenas o veículo alginato de sódio.

Diariamente, foi anotado o consumo de ração e, semanalmente, realizada a biometria dos peixes para reajuste das quantidades das dietas oferecidas. No início e ao final do experimento, após um período

de 15 horas de jejum, foram realizadas coletas de sangue da veia caudal (0,5mL) para determinação dos níveis plasmáticos de cortisol e de glicose. Para a análise da glicose total, foi utilizado o método enzimático e, para os níveis plasmáticos de cortisol, o radioensaio (EIA) com coeficiente de variação inter e intra-ensaios de 1,97ng mL⁻¹ e 0,96ng mL⁻¹, respectivamente (KIT DSL-10-2000 ACTIVE® - EIA).

Ao final do experimento, cada peixe foi anestesiado, eutanasiado por decapitação e imediatamente eviscerado, coletando-se e fixando-se o fígado, que foi mantido durante 24 horas em solução de Bouin. Fragmentos de tecido hepático (10 fragmentos por peixe) foram incluídos em parafina visando à obtenção de cortes transversais na espessura de seis micrômetros que foram corados em hematoxilina eosina (HE) para visualização do citoplasma e núcleo (duas lâminas contendo 10 fragmentos de cada peixe). Para confirmação da presença de glicogênio hepático, mais duas lâminas de cada peixe foram hidratadas e incubadas numa solução de enzima α -amilase salivar e água destilada, na proporção de 1:1, durante 30 minutos, a 37°C, sendo posteriormente coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS). As lâminas foram observadas em microscópio óptico acoplado a um sistema digital, fotografando-se os campos para análise das imagens por meio do software Axiovision 4.1. De cada lâmina, foram registradas 10 imagens em objetiva de 40X, quantificando-se em cada uma o número total de células por campo e medindo-se a área citoplasmática em 10 células por campo selecionado aleatoriamente.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância conforme procedimento GLM do programa computacional SAS (1999). Em caso de significância da análise de variância dos parâmetros pelo teste F, desdobraram-se os graus de liberdade para tratamentos, comparando-se as médias pelo teste de Tukey (P<0,05%). Além disso, foi realizada uma análise de regressão, estabelecendo-se equações para correlacionar as medidas de morfometria dos hepatócitos em função das diferentes doses do extrato de maracujá.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade da água foi mantida num padrão adequado para a manutenção da espécie estudada e não variou entre os tratamentos, registrando-se uma temperatura média de 27°C±0,3°C, oxigênio dissolvido 5,7±0,1mg L⁻¹, pH 6,9±0,2 e concentrações de amônia e nitrito, respectivamente, 0,04±0,01mg L⁻¹ e 0,5±0,04mg L⁻¹.

A adição do extrato não afetou o consumo de alimento e o ganho em peso dos peixes (Tabela 1). Embora sem efeito dos tratamentos, os níveis de glicose aumentaram (Tabela 2), resposta que não pode ser atribuída à ingestão de alimento, semelhante entre os tratamentos.

A administração de glicose nos peixes provoca hiperglicemia prolongada, com variação do tempo de metabolização entre espécies carnívoras e onívoras (GARCIA-RIERA & HEMRE, 1996). Apesar de ter sido comprovada a presença de açúcar redutor total na concentração de 23,7g kg⁻¹ da amostra do extrato (método DNS), o aumento da glicose sanguínea não pode ser atribuído a esta variável, uma vez que resposta semelhante foi observada no grupo controle que recebeu a dieta isenta de extrato. Embora os valores da glicose tenham aumentado, estes variaram respectivamente entre 46,7±7,3mg dL⁻¹ (iniciais) e 63,6±7,9mg dL⁻¹ (finais) sendo considerados normais para a condição de jejum imposta. WRIGHT et al. (2000) registraram para tilápias do Nilo, sob condições laboratoriais, valores médios de 91,9±3,3mg dL⁻¹ e sob jejum valores de 75,4±3,0mg dL⁻¹.

Os níveis de cortisol plasmático reduziram, porém sem diferença entre os tratamentos (Tabela 2). Os valores médios iniciais (14,6±5,1µg dL⁻¹) e finais (5,6±3,2µg dL⁻¹) encontram-se na faixa de normalidade (5 a 60µg dL⁻¹) da tilápia, evidenciando condições adequadas de manutenção (CORREA et al., 2003; BISWAS et al., 2004).

A adição do extrato provocou aumento crescente da área citoplasmática para as doses de 50 e

Tabela 1 - Parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratados durante 28 dias com extrato seco de maracujá (*Passiflora incarnata*) veiculado na dieta (0, 50, 100 e 200mg kg⁻¹).

| Tratamentos Parâmetros | 0 | 50 | 100 | 200 |
|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Peso Inicial (g) | 86,1 ± 5,5 ^a | 88,6 ± 7,6 ^a | 86,6 ± 5,6 ^a | 86,9 ± 7,5 ^a |
| Peso Final (g) | 97,1 ± 11,2 ^b | 96,0 ± 7,1 ^b | 96,7 ± 9,6 ^b | 96,2 ± 11,7 ^b |
| Ganho Peso (g) | 11,1 ± 8,2 | 7,5 ± 3,9 | 10,2 ± 6,7 | 9,2 ± 6,6 |
| Consumo Alimentar (%) | 79,1 ± 16,6 | 73,8 ± 17,4 | 80,2 ± 15,2 | 77,4 ± 15,1 |

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

Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos sanguíneos e histológicos de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratados durante 28 dias com extrato seco de maracujá (*Passiflora incarnata*) veiculado na dieta (0, 50, 100 e 200mg kg⁻¹).

| Tratamentos Parâmetros | 0 | 50 | 100 | 200 |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Glicose Inicial (mg dL ⁻¹) | 44,3 ± 4,9 ^a | 48,3 ± 8,3 ^a | 45,0 ± 4,1 ^a | 49,1 ± 11,7 ^a |
| Glicose Final (mg dL ⁻¹) | 60,0 ± 6,7 ^b | 61,0 ± 10,1 ^b | 66,4 ± 8,3 ^b | 66,9 ± 6,5 ^b |
| Cortisol Inicial (µg dL ⁻¹) | 13,7 ± 4,3 ^a | 14,4 ± 5,9 ^a | 15,9 ± 6,3 ^a | 14,5 ± 3,9 ^a |
| Cortisol Final (µg dL ⁻¹) | 3,8 ± 0,7 ^b | 8,1 ± 6,7 ^b | 6,2 ± 5,0 ^b | 4,2 ± 0,5 ^b |
| Contagem de células* | 158 ± 15 ^A | 139 ± 20 ^B | 124 ± 19 ^C | 141 ± 16 ^B |
| Área citoplasmática** | 181,7 ± 41,3 ^A | 245,8 ± 57,1 ^B | 287,8 ± 78,3 ^C | 257,7 ± 57,8 ^B |

*Contagem de células (n = 240 campos) e morfometria (n = 2.400 células)

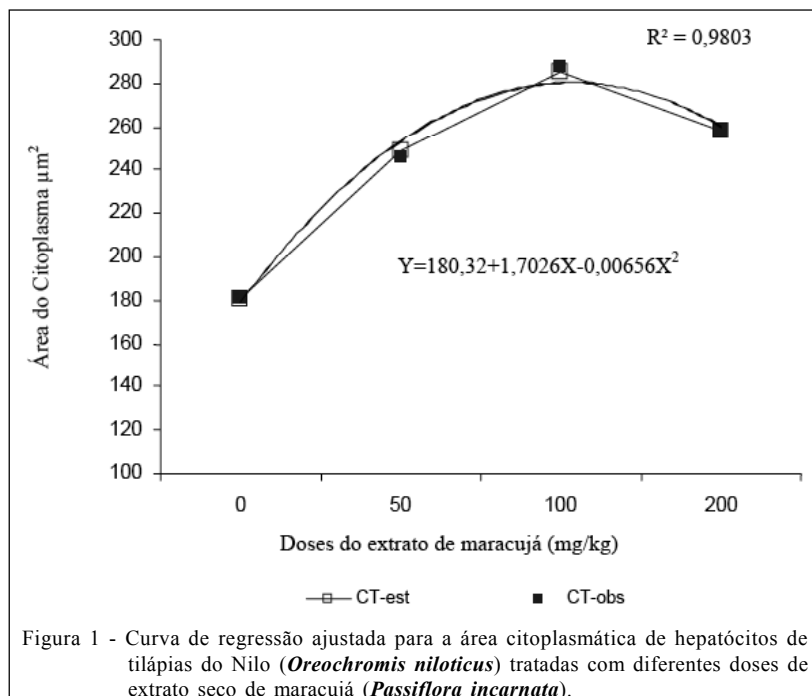
**Morfometria expressa em µm²

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).

100, mas não para a de 200mg kg⁻¹ (Tabela 2), devido ao acúmulo de glicogênio hepático comprovado pela prova da amilase salivar. As curvas de regressão ajustadas indicaram comportamento quadrático para área citoplasmática com a elevação da dose do extrato, resultando em uma curva dose-resposta em forma de “U” invertido (Figura 1). Embora a quantidade de glicogênio hepático armazenado seja dependente do sexo (QUABIUS et al., 1998) e do tamanho dos peixes (TUNG & SHIAU, 1993), as diferenças observadas não podem ser atribuídas a estas variáveis, pois todos os peixes era machos revertidos e com pesos iniciais e finais semelhantes.

A quantidade de glicogênio armazenada no fígado e a capacidade de mobilização dessa reserva de energia, nos períodos de jejum, variam entre os peixes (ENES et al., 2009). Segundo HSIEH & SHIAU (2000), determinadas espécies preservam os estoques de glicogênio metabolizando quantidades significativas de lipídios, enquanto outras conservam parcialmente os estoques de glicogênio, metabolizando proteínas. Existem ainda as que conservam as proteínas e lipídios, utilizando parcialmente as reservas de glicogênio. No caso da tilápia do Nilo, os autores observaram que os peixes previamente alimentados com dieta contendo glicose como fonte de energia apresentaram



mobilização de reservas hepáticas de glicogênio e de lipídio corporal durante a primeira semana de um período de jejum imposto.

Embora neste trabalho tenha sido constatado menor acúmulo de glicogênio hepático no grupo controle (menores áreas citoplasmáticas), fato que poderia ser relacionado à condição de jejum de 15 horas imposta aos animais, observou-se que, nos peixes dos demais tratamentos, também submetidos ao jejum, as reservas mantiveram-se em níveis mais elevados, principalmente para aqueles que receberam 100mg kg⁻¹ do extrato. Esta resposta poderia estar relacionada à atividade dos flavonóides presentes no extrato (3,5-3,9% de flavonóides totais calculados como vitexina) sobre o metabolismo de carboidratos. A atividade hipoglicemiante de flavonóides como puerarina, hesperidina, naringina e miricetina, derivados de vegetais, foi observada em ratos e camundongos diabéticos, em decorrência do aumento da utilização da glicose pelos tecidos periféricos e da síntese de glicogênio pelos hepatócitos (HSU et al., 2003; JUNG et al., 2004; LIU et al., 2005).

CONCLUSÃO

O extrato de maracujá pode ser fornecido na dieta de juvenis de tilápia, sem prejuízo para o consumo alimentar e o crescimento. O produto altera a morfometria dos hepatócitos, sugerindo a atividade de flavonóides sobre o metabolismo de carboidratos.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (USP), (Protocolo 250510).

REFERÊNCIAS

- ALBINATI, A.C.L. et al. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.621-627, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61n3/15.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2010. doi: 10.1590/S0102-09352009000300015
- BARTON, B.A.; IWAMA, 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.1, p.3-26, 1991. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)>. Acesso em: 26 maio, 2010. doi: 10.1016/0959-8030(91)90019-G.
- BISWAS, A.K. et al. Physiological responses in Nile tilapia exposed to different photoperiod regimes. **Journal of Fish Biology**, v.65, p.811-821, 2004. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118756073/PDFSTART>>. Acesso em: 26 maio, 2010. doi: 10.1111/j.0022-1112.2004.00487.x.
- CORREA, S.A. et al. 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. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjbr/v36n12/4955.pdf>>. Acesso em: 26 maio, 2010. doi: 10.1590/S0100-879X2003001200015.
- DE SILVA, S.S.; ANDERSON, T.A. **Fish nutrition in aquaculture**. London: Chapman & Hall, 1995. 319p.
- DHAWAN, K. et al. Evaluation of central nervous system effects of *Passiflora incarnata* in experimental animals. **Pharmaceutical Biology**, v.41, n.2, p.87-91, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1076/phbi.41.2.87.14241>>. Acesso em: 17 maio, 2010. doi: 10.1076/phbi.41.2.87.14241.
- ENES, P. et al. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. **Fish Physiology Biochemistry**, v.35, p.519-539, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/w5j6q6j64q3567u5/fulltext.pdf>>. Acesso em: 17 maio, 2010. doi: 10.1007/s10695-008-9259-5.
- GARCIA-RIERA, M.P.; HEMRE, G.I. Glucose tolerance in turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Aquaculture Nutrition**, v.2, p.117-120, 1996. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119225812/PDFSTART>>. Acesso em: 26 maio, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2095.1996.tb00018.x.
- HEMRE, G.I. et al. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, v.8, p.175-194, 2002. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118961304/PDFSTART>. Acesso em: 17 maio, 2010. doi: 10.1046/j.1365-2095.2002.00200.x.
- HSIEH, S.L.; SHIAU, S.Y. Effects of diets containing different carbohydrates on starved condition in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O.aureus*. **Fisheries Science**, v.66, p.32-37, 2000. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119186982/PDFSTART>>. Acesso em: 17 maio, 2010. doi: 10.1046/j.1444-2906.2000.00004.x.
- HSU, F.L. et al. Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Natural Products**, v.66, p.788-792, 2003. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np0203887>>. Acesso em: 17 maio, 2010. doi: 10.1021/np0203887.
- JUNG, S.H. et al. Effects of medicinal herbs extract on non-specific immune responses, hematology and disease resistance on olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. **Journal of Fish Pathology**, v.15, p.25-35, 2002.
- JUNG, U.J. et al. The hypoglycemic effects of Hesperidin and Naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. **Journal of Nutrition**, v.134, p.2499-2503, 2004. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/134/10/2499>>. Acesso em: 18 maio, 2010.
- KWOM, M.G. et al. The dietary supplementing effects of kugija, *Lycium chinese*, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Edwardsiella tarda*. **Journal of Fish Pathology**, v.1, p.73-81, 1999.

- LIU, I.M. et al. Myricetin as the active principle of *Abelmoschus moschatus* to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. **Planta Medica**, v.71, p.617-621, 2005. Disponível em: <<https://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/plantamedica/doi/10.1055/s-2005-871266>>. Acesso em: 17 maio, 2010. doi: 10.1055/s-2005-871266.
- PEETERS, E. et al. 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. Disponível em: <<http://jas.fass.org/cgi/content/full/82/8/2410>>. Acesso em: 18 maio, 2010.
- QUABIUS, E.S. et al. The influence of polychlorinated biphenyl 126 on tilapia (*Oreochromis mossambicus*) liver. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v.120, p.57-63, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10010-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10010-7)>. Acesso em: 26 maio, 2010. doi: 10.1016/S1095-6433(98)10010-7.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS. **User's guide: statistics**. Version 8.0, Cary, NC, 1999. 515p.
- SEUNG-CHEOL, J.I. Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science**, v.73, p.63-69, 2007. Disponível em: <[http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118521508/PDFSTAR T](http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118521508/PDFSTAR_T) >. Acesso em: 26 maio, 2010. doi: 10.1111/j.1444-2906.2007.01302.x.
- SOULIMANI, R. et al. Behavioral effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, p.11-20, 1997. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/jethpharm>>. Acesso em: 18 maio, 2010. doi: 10.1016/S0378-8741(97)00042-1.
- SPERONI, E.; MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extract from *Passiflora incarnata*. **Planta Medica**, v.54, p.488-491, 1988. Disponível em: <<https://www.thieme-connect.com/ejournals/pdf/plantamedica/doi/10.1055/s-2006-962525.pdf>>. Acesso em: 18 maio, 2010. doi: /10.1055/s-2006-962525.
- SUMPTER, J.P. The endocrinology of stress. In: IWAMA, G.K. et al. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge, UK: Cambridge University, 1997. p.95-118.
- TUNG, P.H.; SHIAU, S.Y. Carbohydrate utilization versus body size in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.104, p.585-588, 1993.
- VIJAYAN, M.M. et al. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v.108, p.321-329, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/07428413>>. Acesso em: 18 maio, 2010. doi: 10.1016/0742-8413(94)00024-5.
- WENDELAAR-BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiology Review**, v.77, p.591-625, 1997.
- WRIGHT, J.R. et al. Glucose homeostasis in the teleost fish tilapia: insights from brockmann body xenotransplantation studies. **American Zoological**, v.40, p.234-245, 2000. Disponível em: <<http://icb.oxfordjournals.org/cgi/reprint/40/2/234>>. Acesso em: 18 maio, 2010. doi: 10.1093/icb/40.2.234.