



INSTITUTO SUPERIOR POLITÉCNICO DE GAZA
FACULDADE DE AGRICULTURA
CURSO DE ENGINHARIA DE AQUACULTURA

Avaliação das concentrações letais do extracto aquoso de alho e seus efeitos em juvenis da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

Monografia a ser apresentada e defendida como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciatura em Engenharia de Aquacultura

Autor: Frâncio Américo Machava

Tutor: Eng. Orbino Alberto Guambe (MSc)

Lionde, julho 2022



INSTITUTO SUPERIOR POLITÉCNICO DE GAZA

Projecto de licenciatura sobre **Avaliação das concentrações letais do extrato aquoso de alho e seus efeitos em juvenis da tilapia nilótica *O. niloticus*** apresentado ao Curso de Engenharia de Aquacultura na Faculdade de Agricultura do Instituto Superior Politécnico de Gaza, como requisito para obtenção do grau de Licenciatura em Engenharia de Aquacultura

Autor: Frâncio Américo Machava

Tutor: Eng. Orbino Alberto Guambe (MSc)



INSTITUTO SUPERIOR POLITÉCNICO DE GAZA

Frâncio Américo Machava “Avaliação das concentrações letais do extracto aquoso de alho e seus efeitos em juvenis da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*)” Monografia Científica apresentada ao curso de Engenharia de Aquacultura, Divisão de Agricultura do Instituto Superior Politécnico de Gaza, como requisito para obtenção do grau de Licenciatura em Engenharia de Aquacultura.

Monografia defendida e Aprovada em 24 de Maio de 2022

Júri

Supervisor

(Eng. Otávio Alberto Guambe, MSc)

Avaliador1

(Eng. Mikosa Nkole, MSc)

Avaliador2

(dr. Miguel Chele, MSc)

Lionde, julho de 2022

Índice

Resumo	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Problema e Justificação	16
1.2. Objectivos	17
1.2.1. Geral	17
1.2.2. Objectivos específicos	17
1.3. Hipóteses.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Tilápia	19
2.2. Maneio de Qualidade de Água.....	19
2.3. Temperatura	19
2.4. Oxigénio dissolvido (OD).....	20
2.5. Potencial de hidrogénio (pH).....	20
2.6. Sistema Hematológico e histológico.....	20
2.7. Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	21
2.8. Vantagens e limitações do uso de extractos vegetais	21
2.9. Métodos para obtenção de extractos vegetais	22
2.10. Percolação ou lixiviação.....	22
3. METODOLOGIA	24
3.1. MATERIAIS.....	24
3.2.2. Delineamento experimental.....	25
3.2.3. Procedimentos experimentais	25
3.2.3.1. Preparação do extracto.....	25
3.2.3.2. Limpeza dos tanques.....	25
3.2.3.3. Monitoramento dos parâmetros de qualidade de água.....	25
3.2.3.4. Determinação da taxa de sobrevivência.....	25

3.2.3.5.	Variáveis a calcular.....	25
3.2.3.6.	Análise Hematológico e histológica	26
3.2.3.7.	Análise estatística	26
4.	RESULTADOS.....	27
5.	DISCUSSÃO.....	32
6.	CONCLUSÃO	33
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
9.	APÊNDICES.....	37
10.	ANEXOS.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do local de estudo.....	24
Figura 2: Brânquias 5x aparentemente normais.	28
Figura 3: 10x necrose branquial	29
Figura 4: 10x brânquias fusionadas	29
Figura 5: 2x redução de fibras musculares	30
Figura 6: 10x fragmentação de fibras musculares	30
Figura 7: 20x fragmentação do músculo	31

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1: Sobrevivência dos juvenis da <i>Oreochromis niloticus</i> em relação ao tempo (horas)	27
Grafico 2: Mortalidade dos juvenis <i>Oreochromis niloticus</i> em relação ao tempo (horas)	27
Grafico 3: Gráfico de linha de ajustada da equação de regressão linear	28

INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Alterações histológicas	31
---	----

Lista das Abreviaturas

% - Percentagem

°C: graus célsius

DCC: Delineamento Completo Causalizado

dr^a: doutora

Eng.^o : Engenheiro

g: Grama

Fig: figura

H: Hora

ISPG: Instituto Superior Politécnico de Gaza

Lc₅₀: Concentração letal

ml/l: Mililitros por litro

No: Número de peixes

NPf: Número de Peixes final

Npi: Número de peixes inicial

O₂: Oxigénio

P - Peso

P/v: Peso por volume

PH: Potencial de hidrogénio

T1: Tratamento 1

T2: Tratamento 2

T3: Tratamento 3

TS: Taxa de sobrevivência



INSTITUTO SUPERIOR POLITÉCNICO DE GAZA

Declaração

Declaro por minha honra que este trabalho de Culminação de Curso é resultado da minha investigação pessoal e das orientações dos meus tutores, o seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto, nas notas e na bibliografia final. Declaro ainda que este trabalho não foi apresentado em nenhuma outra instituição para o propósito semelhante ou de obtenção de qualquer grau académico.

Lionde, julho de 2022

Frâncio A. Machava

(Frâncio Américo Machava)

DEDICATÓRIA

A Deus por estar sempre ao meu lado me dando paz, saúde e forças para que eu siga meu caminho e alcance as minhas metas.

A minha família: aos meus pais Ângela Ndeve e Américo Machava, por terem acreditado em mim, pelo amor, oportunidade, incentivo, e por sempre terem me guiado para o bom caminho do futuro. Ao meu tio Jaime Machava. Ao meu irmão: Delton. A minha avó Melita Bila que foi ela a razão de eu ter chegado aqui devido a sua dedicação durante o ensino geral. Ao meu amigo de infância Elves Sigauque, por estar sempre me apoiado.

EU VOS AMO MUITO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus todo-poderoso por tudo que ele tem feito, mesmo saindo do caminho dele, ele nunca me deixou e por ter-me dado uma família maravilhosa.

Á minha família (Machava), pelo apoio e amor que sempre desempenharam, mesmo estando distantes deles nunca me deixaram.

Aos meus amigos que sempre lutaram para que conseguisse alcançar os meus objectivos

Ao meu supervisor Eng. Orbino Alberto Guambe pelos ensinamentos, incentivos e oportunidades. Sem esquecer todos os docentes os docentes que fizeram parte da minha longa caminhada da formação.

Ao DR.Claudio Laisse e Dr. Selsio da faculdade veterinária da UEM, por terem me ajudado na realização das análises histológicas e ensinamentos.

Aos amigos e colegas da faculdade que sempre me ajudaram durante e mesmo agora tem me ajudado muito, e quem sem amizades deles não estaria aqui: Senésio, Dércio, Abdul, Pilates, Simões, Estêvão, Ernesto (EAPA), Maria de Fátima, Rossana, Ângela, Gilda, eng. Biquiza, eng. Rafael e outros que não foram mencionados os nomes.

Resumo

O alho (*Allium sativum*) é uma planta perene pertencente à família Liliacea, conhecido como agente medicinal terapêutico e profilático muito potente, utilizado em muitas culturas.

A hematologia estuda as células do sangue bem como as alterações dos padrões e os distúrbios morfológicos das células sanguíneas. O trabalho foi realizado no laboratório de campus de Instituto Superior Politécnico de Gaza, os juvenis foram capturados no tanque de geomembrana da mesma instituição com um peso médio de ± 8.85 gramas do desvio padrão, em seguida foram mantidos num tratamento de desinfecção usando sal comum durante 24 horas, e o extracto aquoso de alho foi obtido pelo método de percolação, no experimento usou-se a regressão linear simples com 3 tratamentos (T1=10ml/l, T2=12,5ml/l e T3=15ml/l) e 3 repetições em 9 unidades experimentais com um volume útil de 5L em cada unidade experimental, os mesmos foram expostos durante 24h, 48h e 72hg. Em cada unidade experimental foram alocados 5 juvenis sem alimenta-los e com aeração constante. Depois das 8 horas da introdução do extracto aquoso de alho os juvenis de T2=12,5ml/l e T3=15ml apresentarão uma natação errática e aboquejamento nas superfícies das unidades experimentais, resultando em mortalidades. Após 72h o tratamento T2 apresentou uma percentagem de 60% e no tratamento T3 uma percentagem de 100% de mortalidade, sendo que no tratamento T1 não houve nenhuma mudança comportamental, e em cada tratamento foi retirado um juvenil que serviu de amostra e foram embalsamados e transportados para o laboratório de UEM, onde foram feitas as análises histológicas e hematológicas. Os tratamentos T2 e T3 apresentarão necrose nas lamelas e fragmentação das fibras, sendo que o T1 apresentou aspecto normal. Concluiu-se que a concentração ideal do extracto aquoso de alho que pode ser usada sem causar danos anatomicos para juvenis de tilapia é T1=10ml/l: por não apresentar nenhuma alteração histológica e por não causar nenhuma mortalidade durante o banho terapêutico de 72 horas.

Palavras-chave: tilápianilótica, extrato de alho, concentrações.

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum*) is a perennial plant belonging to the Liliacea family, known as a very potent therapeutic and prophylactic medicinal agent, used in many cultures. Hematology studies blood cells as well as changes in blood cell patterns and morphological disorders. The work was carried out in the laboratory of the Instituto Superior Politécnico de Gaza campus, the juveniles were captured in the geomembrane tank of the same institution with an average weight of ± 8.85 grams of the standard deviation, then they were kept in a disinfection treatment using salt for 24 hours, and the aqueous garlic extract was obtained by the percolation method, in the experiment simple linear regression was used with 3 treatments (T1=10ml/l, T2=12.5ml/l and T3=15ml/l) and 3 replicates in 9 experimental units with a useful volume of 5L in each experimental unit, they were exposed for 24h, 48h and 72h. In each experimental unit, 5 juveniles were allocated without feeding them and with constant aeration 8 hours after the introduction of the aqueous garlic extract, the juveniles of T2=12.5ml/l and T3=15ml will show erratic swimming and pouting on the surfaces of the experimental units, resulting in mortalities. After 72h, treatment T2 showed a percentage of 60% and treatment T3 a percentage of 100% mortality, and treatment T1 had no behavioral change, and in each treatment a juvenile was removed and served as a sample and they were embalmed and transported to EMU laboratory, where histological and hematological analyzes were performed. The treatments T2 and T3 will present necrosis in the lamellae and fragmentation of the fibers, being that the T1 presented normal aspect. It was concluded that the ideal concentration of aqueous garlic extract that can be used without causing anatomical damage to juvenile tilapia is T1=10ml/l: because it does not present any histological alterations and because it does not cause any mortality during the 72-hour therapeutic bath.

Keywords: Nile tilapia, garlic extract, concentrations.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é a actividade que se dedica a produção de alimentos com maior crescimento anual, actualmente é responsável por quase 50% da produção de pescado (FAO, 2012).

A produção de tilápia corresponde a uma importante parcela da produção continental de pescado (FAO, 2010). Por ser uma espécie capaz de tolerar regimes de criação intensivos, com uma taxa de crescimento satisfatória e boa aceitação de seus produtos pelo mercado, o interesse em seu cultivo é crescente (IBGE, 2013).

Durante o processo de cultivo, os peixes são constantemente submetidos a diferentes procedimentos de manejo e variações ambientais, que podem alterar o equilíbrio orgânico e podem levar a alterações em seu metabolismo, comprometendo sua imunidade. Sabe-se que alterações no sistema imune de peixes provocados por agentes externos estão directamente associadas à significativa redução na sua resistência a doenças (Roberts, 2012).

A hematologia estuda as células do sangue bem como as alterações dos padrões e os distúrbios morfológicos das células sanguíneas. Esse tecido tem como função distribuir calor, transportar os gases respiratórios, nutrientes, hormônios e produtos de excreção, além de actuar na defesa do organismo (TAVARES-DIAS *et al.*, 2009).

São vários produtos de origem vegetal e inorgânicos usados para o tratamento de doenças, mas deles regista se o inconveniente na determinação das doses certas. Segundo GOMES (2011), na aquicultura usa-se mais o extracto de piri-piri, de alho e de gengibre.

O alho (*Allium sativum*) é uma planta perene pertencente à família Liliacea, conhecido como agente medicinal terapêutico e profilático muito potente, utilizado em muitas culturas (MAULIK, 2002)..

As investigações relativas ao efeito do extracto de alho em tilápias representam uma alternativa para a substituição do uso de antibióticos e quimioterápicos no tratamento de doenças infecciosas e/ou parasitárias, melhorando a condição de saúde dos peixes e reduzindo os potenciais danos ao meio ambiente, ao consumidor e potencializando a produção orgânica ou agroecológica (IBGE, 2013).

O presente trabalho tem como objectivo avaliar as concentrações letais de extrato aquoso de alho e seus efeitos em juvenis da tilápia nilótica.

1.1.Problema e Justificação

O alho (*Allium sativum L.*) é uma planta rica em alicina, podendo ser utilizada no controle de diversas doenças que acometem os peixes, também apresenta actividade imune estimulante, anticancerígena, hepatoprotetora, antioxidante, antiviral, antifúngica e também antiparasitária (KEMPER, 2000).

A intensificação da produção tem como consequência o aumento da ocorrência de enfermidades, tornando um fator limitante na produção de tilápias.

O uso de produtos naturais, com comprovadas ações medicinais, tem sido uma alternativa para minimizar a incidência de doenças e melhorar o desempenho produtivo. Os extratos vegetais são compostos naturais e inócuos, e têm grande potencial de uso na aquicultura como promotores de crescimento, imunoestimuladores, antibióticos e anti-estresse. O interesse pelo uso de imunoestimulantes a base de extratos vegetais tem aumentado nos últimos tempos por todo o mundo, devido à facilidade de preparo, raros efeitos colaterais aos animais e ao meio ambiente e baixo custo,

Poucos são estudos feitos em Moçambique que destacam as melhores concentrações de extracto de alho durante banhos terapêuticos, a fim de não haver perdas dos peixes e extractos durante o tratamento.

Contudo, a dosagem correcta na aplicação do fitoterápico é essencial porque as propriedades imunoestimulantes do vegetal desaparecem em altas concentrações (NDONG & FALL, 2011). Além disso, o alho deve ser utilizado na forma de extracto cru, pois temperaturas elevadas desnaturam a alicina, ocasionando perdas das propriedades antimicrobianas (MADSEN *et al*, 2000).

1.2.Objectivos

1.2.1. Geral

✓ Avaliar as concentrações letais do extrato aquoso de alho e seus efeitos em juvenis da tilàpia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

1.2.2. Objectivos específicos

- ✓ Fazer a análise histológica e hematológica das brânquias e músculo;
- ✓ Determinar a taxa de mortalidade e de sobrevivência dos peixes;
- ✓ Identificar a concentração do extrato aquoso de alho que não é letal aos juvenis da tilàpia nilótica.

1.3.Hipóteses

Ho: Todas as concentrações de extractos de alho são letais aos juvenis da tilápia nilótica.

Ha: Pelo menos uma concentração de extrato de alho não é letal aos juvenis da tilápia nilótica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tilápia

A tilápia pertence à família Cichlidae e é originária de países da África e do Oriente Médio (RIBEIRO & MOREIRA, 2012).

A tilápia é uma espécie tropical de hábito diurno que habita preferencialmente em águas rasas de rios, lagos e canais de irrigação, doce e salobra (FishBase, 2015). É um peixe omnívoro forrageiro que se alimenta de fitoplâncton, perifíton, plantas aquáticas, pequenos invertebrados, fauna bêntica, detritos e biofilmes associados a estes, sendo a secreção de muco para captação de plâncton na cavidade bucal uma característica própria da espécie (FAO, 2015).

A tilápia é uma espécie ovípara que atinge a maturidade sexual ao redor dos 5-6 meses, ocorrendo desova quando a temperatura da água está em torno de 24°C. O processo reprodutivo começa quando o macho estabelece seu território, escava um ninho de 20 a 50 cm de diâmetro no substrato e passa a protegê-lo, atraindo uma fêmea e cortejando-a por horas (RIBEIRO & MOREIRA, 2012).

Os machos atingem o peso comercial mais cedo. Tilápias podem viver por mais de 10 anos e pesar aproximadamente 5 kg (MAPA, 2007).

Alterações em factores ambientais, nutricionais, genéticos e sanitários podem causar alterações no ambiente de cultivo que tornam as tilápias menos resistentes a certos patógenos comumente encontrados na água, porém, sem determinar doença nos peixes (Pavanelli, Eiras *et al.*, 2002;).

2.2. Maneio de Qualidade de Água

Na piscicultura a qualidade da água não só influencia no crescimento dos peixes, como também é através dela que se determina a sobrevivência dos mesmos. O controle da água e o manejo adequado são práticas indispensáveis para o sucesso da piscicultura (Ribeiro, 2001).

Factores como oxigénio dissolvido, temperatura, pH e transparência entre outros, estão directamente relacionados com o desenvolvimento dos peixes (Kubitza 2003).

2.3. Temperatura

A tilápia é uma espécie tropical, apresenta conforto térmico entre 27 a 32 °C, também é uma espécie pecilotérmica ou seja, a sua temperatura interna é regulada pela temperatura do ambiente, que tem profundo efeito sobre o crescimento, taxa de alimentação e metabolismo dos animais (Laevastu & Heyes citados por Pereira 2012), que abaixo desse valor começa a ocorrer um declínio no crescimento dessa espécie. Em temperaturas abaixo de 11°C as tilápias

não resistem e começam a morrer, e abaixo de 7°C há existência de uma mortalidade em massa da população (RIBEIRO&MOREIRA, 2012).

2.4.Oxigénio dissolvido (OD)

O oxigénio é essencial à vida dos organismos aquáticos e baixas concentrações de oxigénio dissolvido na água podem causar atraso no crescimento, redução na eficiência alimentar dos peixes, aumento na incidência de doenças e na mortalidade dos peixes. O nível recomendado de oxigénio dissolvido em produção de tilápias é acima de 4mg/l. A capacidade de suportar baixas concentrações de oxigénio parece ser uma qualidade de todas as espécies de tilápias, podendo inclusive sobreviver em níveis tão baixos quanto 1mg/litro (POLLI *et al* 2004).

2.5.Potencial de hidrogénio (pH)

O pH é um parâmetro muito importante nos ambientes aquáticos, podendo ser a causa de muitos fenômenos químicos e biológicos, porém também pode ser consequência de outra série de fenômenos. O potencial hidrogênio-iônico da água (pH) indica o grau de acidez, em escala que varia de 0 a 6,9 (ácido); 7 (neutro) e de 7 a 14 (básico ou alcalino), (FIGUEREDO, 2013).

Os valores de pH entre 7 e 8 são aconselhados para a obtenção dos melhores resultados de engorda. Valores inferiores a 3,5 e acima de 12 causam mortalidade total dos exemplares em menos de 6 horas de exposição (ARANA, *et al*, 2004).

2.6.Sistema Hematológico e histológico

A hematologia estuda as células do sangue bem como as alterações dos padrões e os distúrbios morfológicos das células sanguíneas. Esse tecido tem como função distribuir calor, transportar os gases respiratórios, nutrientes, hormônios e produtos de excreção, além de actuar na defesa do organismo (TAVARES-DIAS *et al.*, 2009). Assim, através do sangue é possível fazer diversas análises que demonstram as condições fisiológicas, possíveis alterações metabólicas decorrentes de diferentes condições de cultivo em animais, bem como no diagnóstico de enfermidades (LAZZARI, *et al.*, 2011;). Estabelecidos os valores sanguíneos de referência para uma determinada espécie, é possível monitorar alterações destes valores sob condições controladas (SILVA-SOUZA, 2004), uma vez que os mesmos são susceptíveis à mudanças do ambiente aquático, auxiliando na compreensão do processo de adaptação dos animais ao ambiente (RANZINI-PAIVA *et al.*, 2005).

As análises histológicas são ferramentas eficientes para o diagnóstico e identificação de alterações ocasionadas em tecidos e órgãos dos peixes. Vários órgãos podem ser utilizados nas análises histológicas, porém os órgãos mais afectados são brânquias e pele (SHEPHARD, 1994; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

2.7. Alho (*Allium sativum* L.)

O alho (*Allium sativum*) é uma planta perene pertencente à família Liliacea, conhecido como agente medicinal terapêutico e profilático muito potente, utilizado em muitas culturas. Os componentes fitoterápicos do alho estão localizados no bolbo, este é constituído pelo conjunto de bolbilhos que se formam pelo desenvolvimento das gemas do caule, sendo recobertos por folhas escamiformes. Esta planta herbácea pode chegar a 60 cm de altura (BANERJEE; MAULIK, 2002).

A alicina é um composto bioactivo, instável, com odor forte característico, possui acção antiviral, antifúngica e antibacteriana. É produzida com a trituração dos bolbilhos, que provoca a transformação da aliina₂ através da acção da enzima alinase, em alicina (CARVALHO, 2004).

Devido às suas potentes propriedades medicinais, o alho vem sendo indicado em pisciculturas de diversos países para diferentes espécies de peixes (EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 2009). Essas propriedades são comprovadas por pesquisas que têm demonstrado a eficácia do alho como imunoestimulantes e na eliminação dos principais microrganismos de peixes de água doce (LEE; GAO, 2012), como exemplo, *Trichodina* sp. em alevinos de tilápias (CHITMANAT *et al.*, 2005), *Aeromonas hydrophila* em alevinos de truta arco-íris (NYA *et al.*, 2010) e melhora na taxa de sobrevivência em tilápia do Nilo; Ainda, estudos de Buchmann *et al.* (2003) demonstraram a eficácia do extracto de alho nas concentrações de 117 mg/L e 570 mg/L após 24 horas de teste *in vitro* contra agentes infecciosas.

Segundo Lu *et al.* (2012), estudos com produtos naturais em pisciculturas tornam-se necessários, pois o mercado está cada vez mais exigente em relação à qualidade e sustentabilidade do produto, com isso, os piscicultores estão tendo que se adequar aos novos parâmetros do mercado como, qualidade, segurança, eliminação de poluentes, concomitantes, antibióticos e agentes cancerígenos durante as actividades aquícolas.

O óleo essencial de alho (*Allium sativum*) pode ser uma alternativa a ser utilizada na aquicultura, como um fitoterápico em substituição aos produtos químicos, promotor da qualidade dos ambientes de reprodução artificial. Este produto pode ser factível, economicamente viável e ambientalmente correcto para a piscicultura, contribuindo com a sustentabilidade (LEE; *et al.*, 2012).

2.8. Vantagens e limitações do uso de extractos vegetais

A principal vantagem relacionada ao uso de extractos vegetais em protecção de animais, quando comparados aos produtos sintéticos, deve-se ao fato de gerar novos compostos, os

quais os patógenos não se tornaram capazes de inactivar, além de serem menos tóxicos, serem degradados rapidamente pelo ambiente, possuírem um amplo modo de acção e de serem derivados de recursos renováveis (FERRAZ, 2008).

Entretanto, os extractos apresentam algumas limitações, como a falta de controlo de qualidade, baixa estabilidade dos compostos orgânicos presentes nas soluções e o não monitoramento de possíveis substâncias tóxicas presentes nas plantas ou resultantes da decomposição dos produtos durante sua manipulação (NYA *et al.*, 2010).

Tais limitações fazem com que seja necessária a investigação mais aprofundada dos extractos de plantas, bem como o desenvolvimento de produtos com maior nível tecnológico, para que produtores e consumidores possam ter segurança na utilização de extractos brutos (SILVA *et al.*, 2005). Também são limitações relacionadas aos extractos: rápida degradação (por luz e/ou calor), período curto de viabilidade, disponibilidade de matéria-prima, técnicas de extracção e aplicação dos produtos e a falta de regulamentação que estabeleça a sua utilização (POTENZA, 2004). Apesar disso, o uso de produtos botânicos surge como uma opção de manejo de pragas e patógenos, que, associada a outras práticas, pode contribuir para a redução de doses e aplicações de produtos químicos sintéticos (MACHADO *et al.*, 2007).

2.9. Métodos para obtenção de extractos vegetais

Os estratos são preparações concentradas, que possuem consistências diversas, obtidas de matérias-primas vegetais secas, tratadas ou não previamente (inactivação enzimática, moagem ou esmagamento, entre outros) e preparadas por processos que envolvem a utilização de solventes. O processo de separação desses produtos naturais bioactivos corresponde a três fases principais: extracção a partir da matéria vegetal, fraccionamento do extracto ou óleo e purificação do princípio activa (LIMA, 2011). O produto é obtido pela passagem de um solvente, como por exemplo, a água ou o álcool etílico, através de partes de planta moída ou não, de modo a se retirar os princípios activos contidos no vegetal (STADNIK & TALAMINI, 2004). O termo extracção significa retirar, da maneira mais selectiva e completa possível, as substâncias ou fracção activa contidas na droga vegetal, utilizando, para isso, uma mistura de líquidos tecnologicamente e toxicologicamente apropriados (MACIEL, 2002).

Para se escolher um método de extracção, deve-se avaliar a eficiência, estabilidade das substâncias extraídas, disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extracto a ser preparado. Os principais métodos de extracção são maceração, percolação, infusão, decocção, extracção em aparelho de Soxhlet e destilação por arraste a vapor (SILVA *et al.*, 2005).

2.10. Percolação ou lixiviação

A percolação é um dos métodos de extracção mais utilizados (PANDEY & TRIPATHI, 2014), devido à facilidade técnica, ao custo efectivamente baixo e o menor risco de reacções químicas entre soluto e solvente e realizado a temperatura ambiente (MACIEL, 2002).

A técnica de percolação inicia-se com o humedecimento homogéneo da droga com o solvente, parcial ou total, em um recipiente, deixado em maceração por um período de 2 a 4 horas. Após este período, o macerado é levado ao percolador e acomodado para que não haja a formação de canais preferenciais do solvente. Este permanecerá em repouso por até 24 horas e, se necessário, pode-se acrescentar mais solvente. A torneira do percolador é aberta e o extracto goteja. Finalizado o gotejamento, o extracto retorna por 4 a 10 vezes ao percolador, permanecendo em repouso por 2 a 4 horas. A torneira é aberta e ocorre novo gotejamento (HANDA, 2008;).

A vantagem deste método é que o tratamento mecânico do material sólido é baixo pela ausência de mobilidade e durante a passagem do solvente ocorre uma filtragem que retêm o material fino resultando em um índice mínimo de partículas finas na solução do extracto (MACIEL, 2002).

3. METODOLOGIA

3.1.MATERIAIS

Para realização do experimento usou-se os materiais abaixo mencionados com as respectivas funções:

- ✓ Matérias de Limpeza (pano e vassoura)
- ✓ Materiais de preparação do extracto aquoso (alho, pilão, bacia, água destilada e pano)
- ✓ Equipamento de monitoria de qualidade de água (multiparâmetro)
- ✓ Matérias de protecção (luvas, mascara e bata)
- ✓ Material Informático (Computador, Papel A4)
- ✓ Maneio dos peixes (punça)
- ✓ Matéria-prima (juvenis e alho)
- ✓ Material para a colecta histológica (pinça e frascos).

3.2.Métodos

3.2.1. Descrição do local do estudo

O experimento foi realizado no campo experimental do Instituto Superior Politécnico De Gaza em Lionde. O posto administrativo de Lionde, localiza-se no distrito de Chókwè a Sul da província de Gaza, no curso médio do rio Limpopo, apresenta como limites a Norte o rio Limpopo que o separa dos Distritos de Massingir, Mabalane e Guijá, a Sul o distrito de Bilene (MAE, 2005).

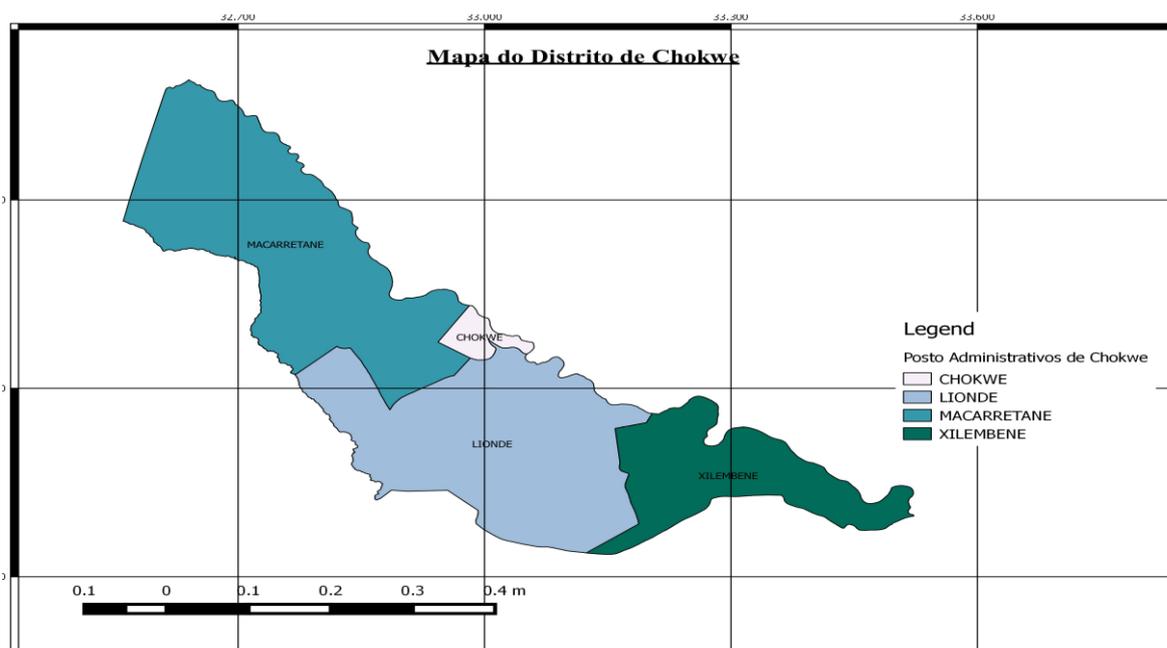


Figura 1: Mapa do local de estudo. Fonte (autor)

3.2.2. Delineamento experimental

O trabalho foi realizado em forma de um experimento, onde foi usado regressão linear simples, com 3 tratamentos de extratos de alho (T1-10ml/l; T2-12,5ml/ e T3- 15ml/l), e três repetições, onde foram povoados 45 juvenis obtidos nos tanques de ISPG, estes juvenis foram mantidos em jejum e desinfectados, de seguida distribuídos aleatoriamente em 9 unidades experimentais e alocados 5 juvenis com um peso médio de ± 19 gramas e ± 8.85 gramas do desvio padrão em cada tratamento, o experimento teve uma duração de 72horas.

3.2.3. Procedimentos experimentais

3.2.3.1.Preparação do extracto

Para a extracção do extracto aquoso de alho, baseou-se na metodologia descrita por Souza (2010), onde 30g de alho esmagado está para 100ml de água destilada, para a sua obtenção fez-se a pesagem e descascou-se o alho em seguida esmagou-se 2kgs de alho e misturou-se-lhas num recipiente de 5 litros, e foi deixado durante 24h, antes do inicio do processo de percolação do extracto, usou-se algodão como filtro para impedir a entrada de matérias indesejáveis. E nesta reacção obteve se 4.500ml de extracto aquoso de alho. Depois fez as análises físico-químicas e o extrato aquoso apresentou: $p^H - 7.9$; humidade 12.2 e acidez total-25.12.

3.2.3.2.Limpeza dos tanques

A limpeza das bacias experimentais consistia na retirada de todos os poluentes para que durante o experimento não haja materiais indesejáveis.

3.2.3.3.Monitoramento dos parâmetros de qualidade de água

Fez-se o monitoramento 3 vezes ao dia e uma vez que a aeração era constante só monitorou-se a temperatura usando o multiparâmetro.

3.2.3.4.Determinação da taxa de sobrevivência

Esta etapa consistiu no cálculo da taxa de mortalidade e de sobrevivência obtidas no experimento.

3.2.3.5.Variáveis a calculados

$$\text{Taxa Sobrevivência: } TS(\%) = \frac{N_{pf}}{N_{pi}} \times 100$$

$$\text{Taxa de mortalidade acumulada: } TMAc(\%) = \frac{NPm}{NPT} \times 100$$

TMAc_ taxa de mortalidade acumulada

TSAc - taxa de sobrevivência acumulada

NPm - número de peixes mortos

NPt - número total de peixes

TS - taxa de sobrevivência

NPi- número de peixes iniciais

NPf – número de peixes finais

3.2.3.6. Análise Hematológico e histológica

Após o fim do experimento, em cada unidade experimental retirou-se aleatoriamente duas amostras em seguida foram embalsamados e encaminhados para o laboratório da faculdade veterinária da UEM para o efeito das análises. Onde primeiro fez se a colecta das amostras branqueias e do másculo, de seguida foram colocados nos frascos que continha lá álcool 100%, formol a 10% e xilol a 100%; depois de 24h foram retiradas para as lâminas onde ocorreu o processo de desidratação, após uma semana de desidratação foram feitas as análises microscópicas.

3.2.3.7. Análise estatística

Os dados foram submetidos à ANOVA para a verificação da homogeneidade e a normalidade, a teste de Tukey para identificação das diferenças significativas, a nível de significância de 5%. Também foi aplicada regressão linear simples para avaliar a relação entre as concentrações e as mortalidades. Todas as análises foram feitas com auxílio do pacote estatístico minitab18.0.

4. RESULTADOS

Teste das concentrações agudas (Lc50) de extracto aquoso de alho durante 72h

Os testes com as concentrações crescentes de extracto de alho foram realizados para definir as concentrações letais.

T1 apresentou 100% de sobrevivência em 72 horas. Sendo que T2 apresentou 60% de sobrevivência e T3 sem nenhuma sobrevivência, como ilustra o gráfico 2.

Taxa de sobrevivência

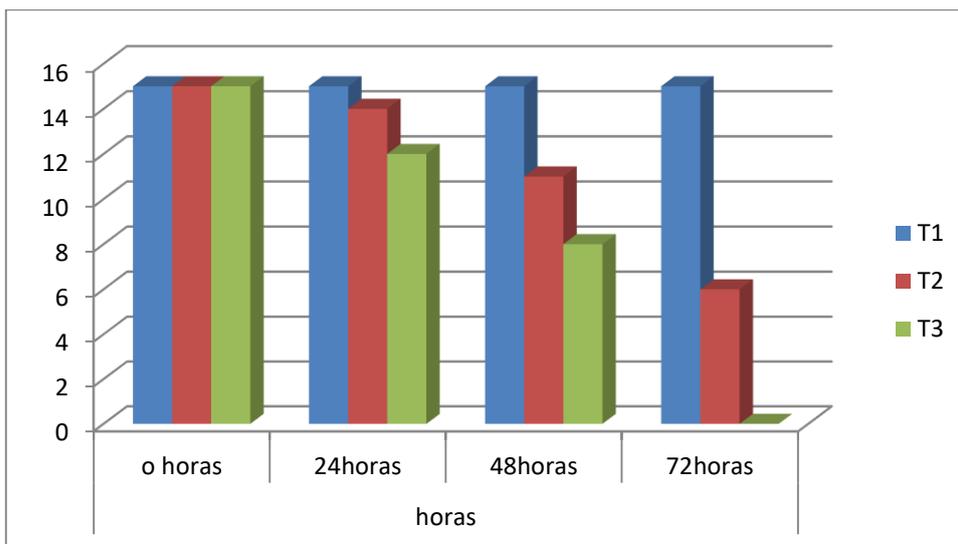


Gráfico 1: Sobrevivência dos juvenis da *Oreochromis niloticus* em relação ao tempo (horas)

O tratamento que apresentou mais taxa de mortalidade foi T3=100%, T2 com 40% e T1 sem nenhuma mortalidade (gráfico 1).

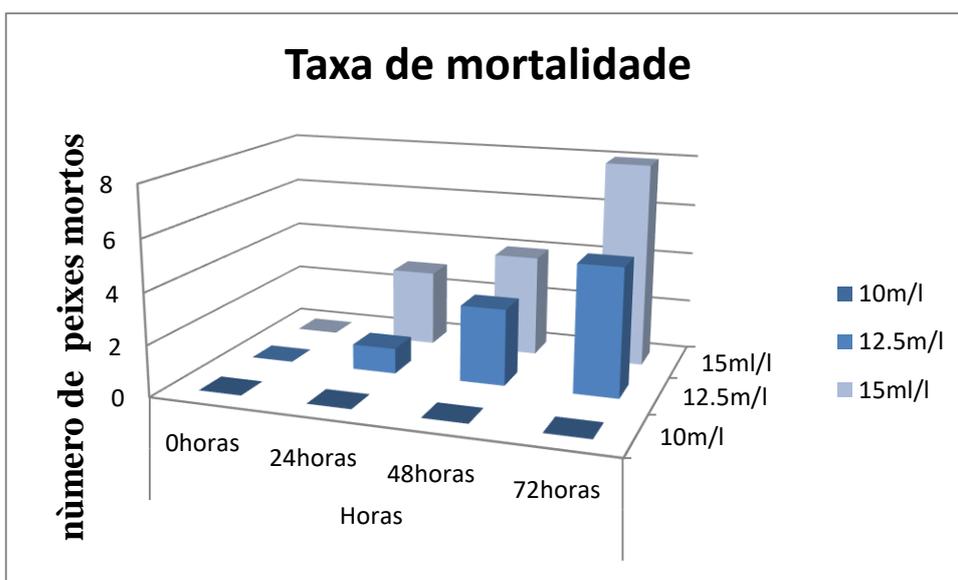


Gráfico 2: Mortalidade dos juvenis *Oreochromis niloticus* em relação ao tempo (horas)

A equação e o gráfico abaixo ilustram o tratamento que apresentou maior mortalidade no experimento.

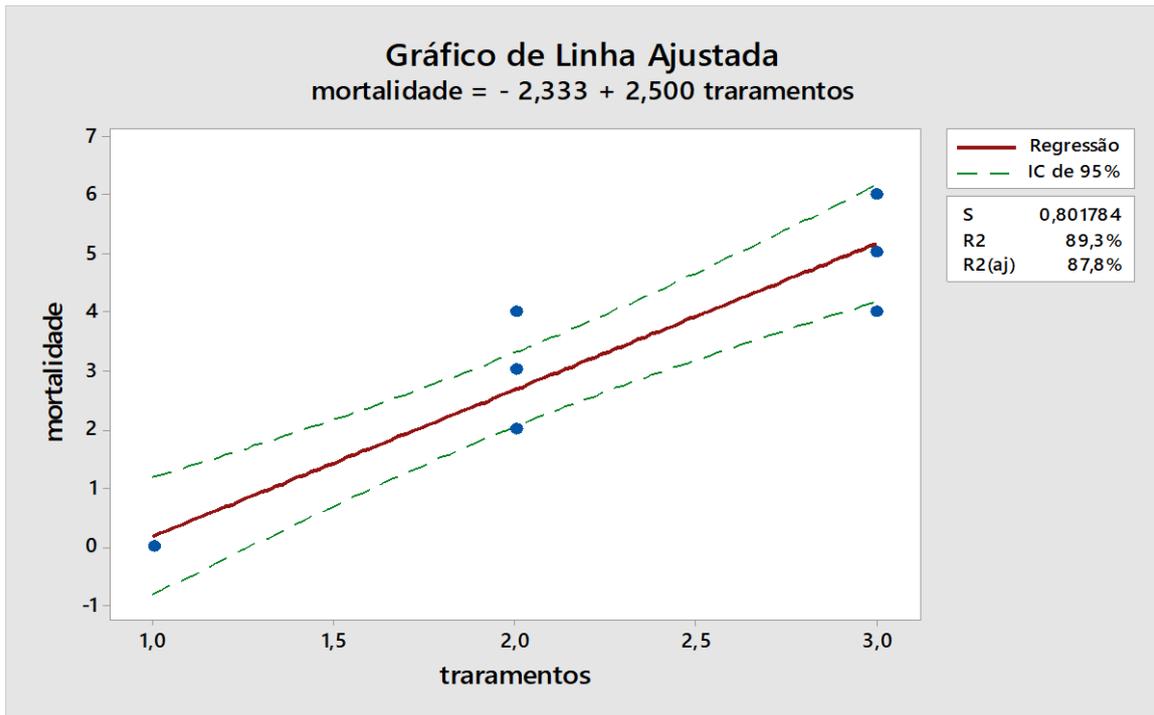


Gráfico 3: Gráfico de linha ajustada da equação de regressão linear

Avaliação histológica de brânquias e músculo

Durante as análises laboratoriais histológicas realizados observou-se que na concentração de 10mlt/l órgãos do animal apresentaram uma estrutura normal (figuras 2). Diferente de 12,5mlt/l e 15mlt/l que foi observado muitas alterações anatómicas (fragmentação de fibras musculares, necrose de lamelas branquiais, encurtamento das lamelas e fragmentação das fibras musculares).

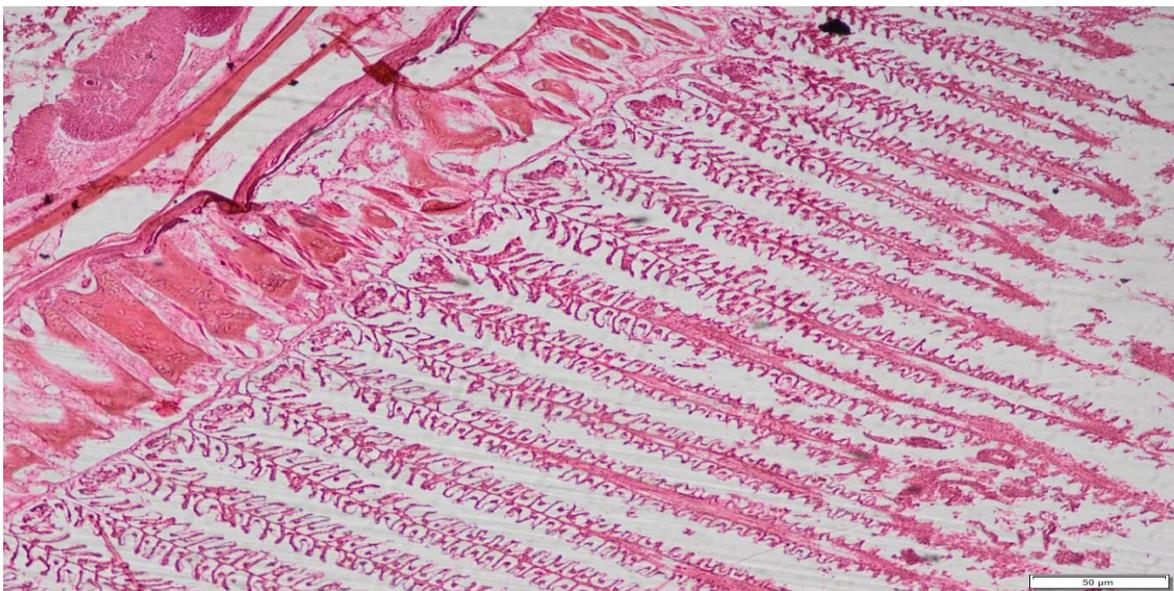


Figura 2: Brânquias 5x aparentemente normais.

A proliferação do epitélio filamentar estendeu-se a toda a área epitelial conduzindo à fusão quase completa das lamelas.

A necrose constituiu outro tipo de lesão observado, a qual foi mais acentuada na base do epitélio filamentar estendendo-se, por vezes, na sua totalidade (figura 3).

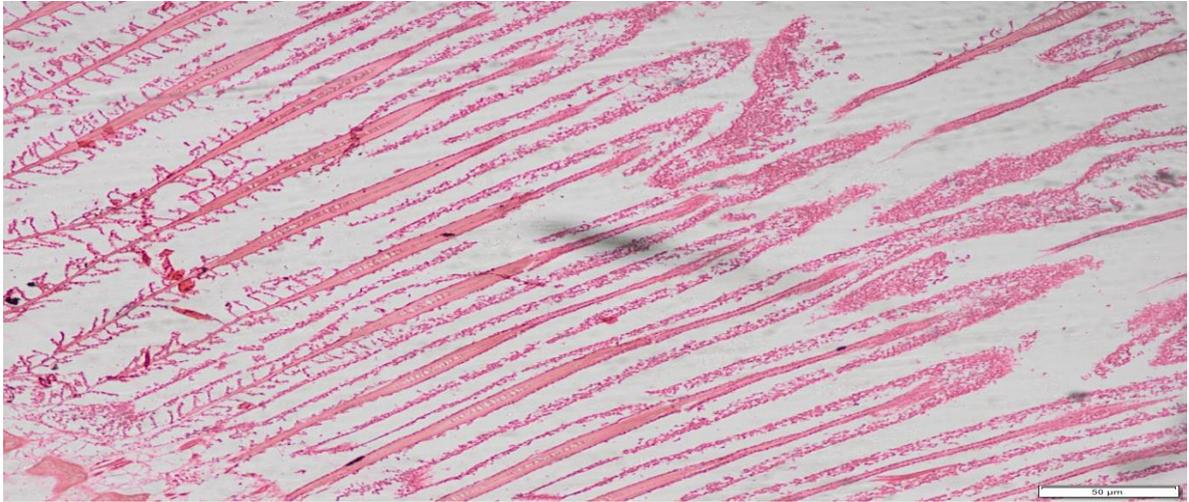


Figura 3: 10x necrose branquial

Fusionamento das brânquias, este tipo de lesão caracterizou-se pela condensação dos núcleos e ruptura das membranas celulares e resultou da acção directa do extracto. A vasodilatação marcada do eixo vascular das lamelas também foi observada, tendo por vezes conduzido à ruptura das células pilar com perda da sua capacidade de suporte. Esse fato pode ter conduzido ao aparecimento de encurtamentos das lamelas que estão representados na Figura 4.



Figura 4: 10x brânquias fusionadas

As mudanças nessas estruturas das fibras musculares são devidos a decomposição por reacções enzimáticas intrínsecas e por enzimas bacterianas. No tratamento T1, 100 % dos juvenis apresentaram hiperplasia leve do músculo (Figura 5).

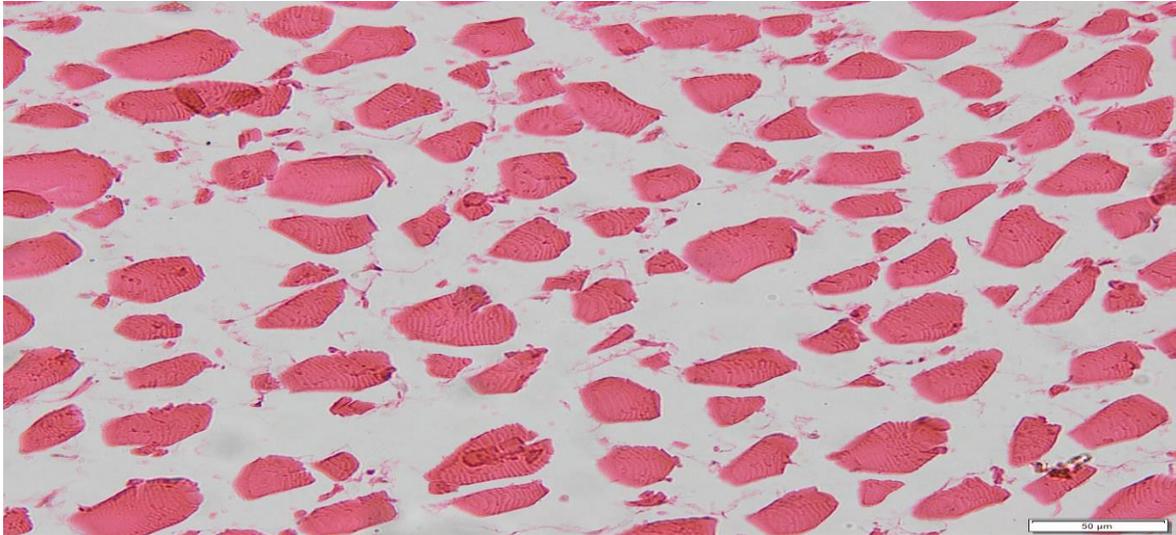


Figura 5: 2x redução de fibras musculares

No tratamento T2, 100 % dos juvenis apresentaram hiperplasia moderada e grave, do músculo (figura 6).

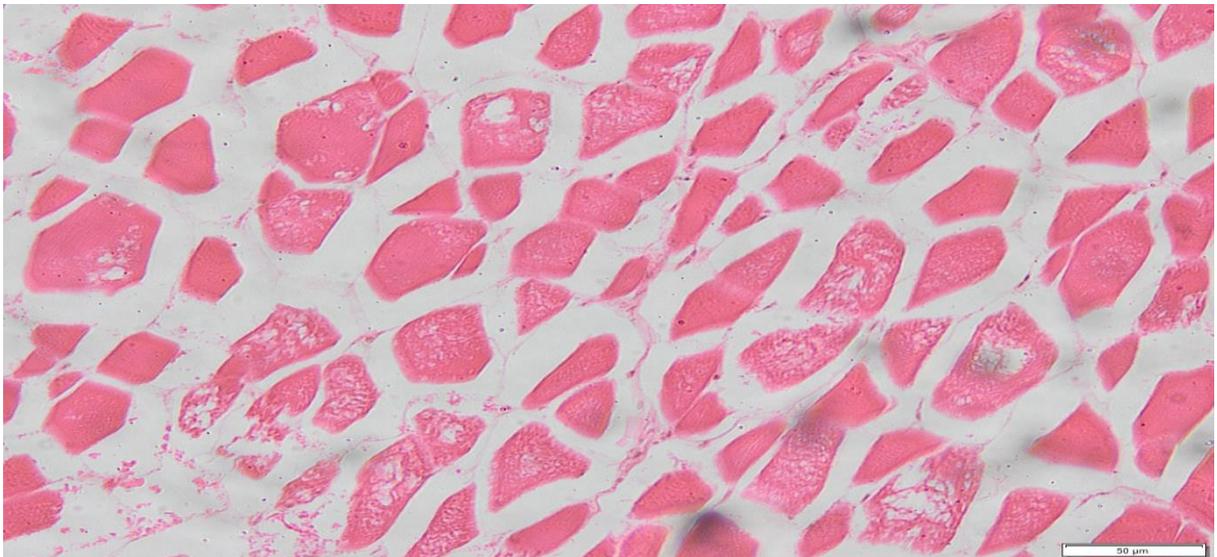


Figura 6: 10x fragmentação de fibras musculares

No tratamento T3, 100 % dos juvenis apresentaram hiperplasia grave de fragmentação das fibras musculares e 66 % apresentaram perda do epitélio respiratório e necrose (Figura 7).

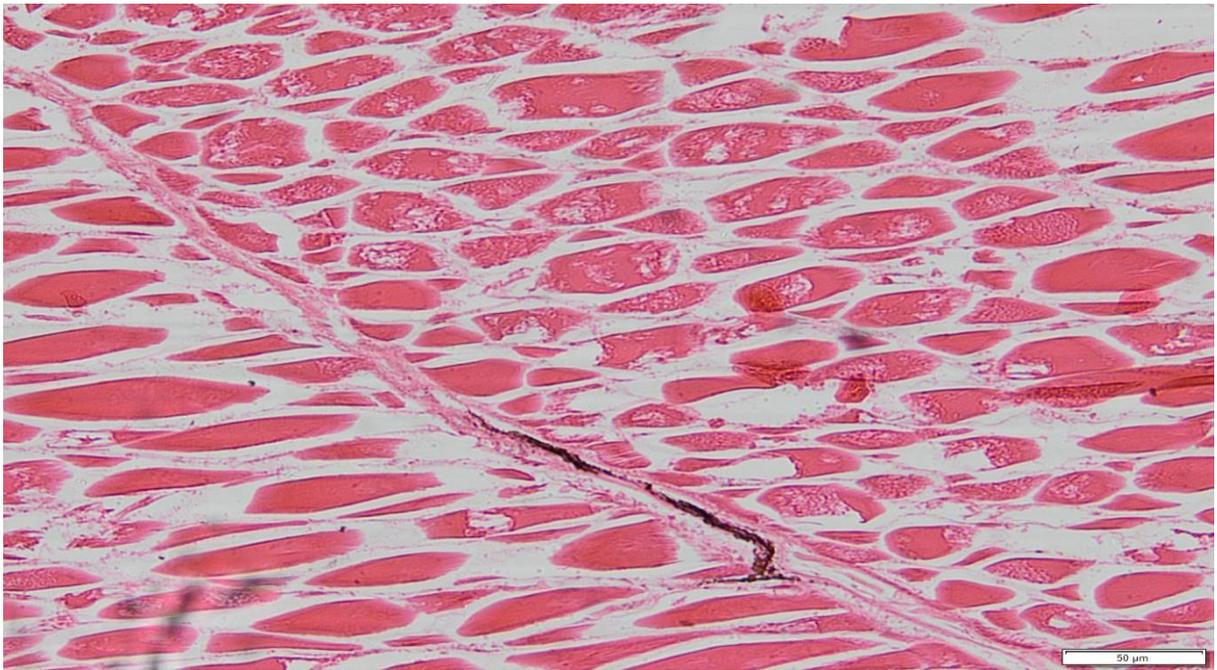


Figura 7: 20x fragmentação do músculo

Tratamentos	Órgãos	Alterações histológicas observadas	Observação
T1	Brânquias	Morfologia aparentemente normal	Figura 2
	Musculo	Pouca fragmentação de fibras musculares	Figura 3
T2	Brânquias	Necrose de lamelas branquiais	Figura 4
	Musculo	Fragmentação de fibras musculares (++++)	Figura 5
T3	Brânquias	Encurtamento das lamelas branquiais	Figura 6
	Musculo	Fragmentação de fibras musculares (++++++)	Figura 7

Tabela 1: Alterações histológicas

Descrição

No tratamento 1: as brânquias continuaram a apresentar a estrutura morfológica de um peixe vivo. O músculo sofreu poucos fragmentos fáceis de se cicatrizar .

No tratamento 2: as brânquias sofreram a necrose laminar: que se caracteriza pela destruição do córtex cerebral. O músculo sofreu a fragmentação de fibras: que é a quebra das fibras do músculo e essas fibras são constituídas por várias miofibrilas, os elementos contráteis do músculo ou unidades estruturais do músculo.

No tratamento 3: as brânquias sofreram o encurtamento das lamelas: que é a perda da elasticidade ou movimentação das lamelas. O músculo sofreu uma fragmentação de fibras: houve mais quebras ou divisões nas estruturas das fibras musculares, as que condicionou a rápida mortalidade dos alevinos.

5. DISCUSSÃO

Testes preliminares de toxicidade aguda são realizados para definir a faixa letal aos organismos testados para, posteriormente, serem realizados os testes definitivos letais em relação a algum tóxico, o que dá mais confiabilidade aos testes definitivos (Sampaio *et al.* 2002; Fájér-Ávila *et al.* 2003). A faixa de letalidade com extrato de alho para juvenis da tilápia nilótica foi observada em concentrações superiores a 10 ml/l.

As lesões causadas por estes produtos são umas das hipóteses para explicar a presença de hiperplasia leve nos exames histológicos das brânquias. Vários estudos colaboram com esta informação, mas apontam diferentes intensidades de hiperplasia muscular ou branquial e a ocorrência de outras lesões como respostas imediatas do animal (Martins & Romero 1996; Montero *et al.* 2004; Schalch *et al.* 2006; Dezfuli *et al.* 2007).

Outra hipótese do aparecimento de hiperplasia no grupo controle é o estresse causado pela manipulação dos peixes, normalmente observado em pisciculturas intensivas, como relatado por Oba *et al.* (2009), porém este efeito não foi analisado neste estudo.

A vasodilatação do eixo vascular das lamelas conduziu, por vezes, à ruptura das células pilar com perda da sua capacidade de suporte, levando ao aparecimento dos aneurismas lamelares. Resultados similares foram observados por Thophon *et al.* (2003) em *L. calcarifer* também submetidos à exposição extrato aquoso de alho.

A concentração superior a 10 ml/l de extrato de alho causa necrose nas brânquias e fragmentação do músculo após 48 h de exposição. No entanto, estes resultados não podem ser automaticamente estendidos a outras espécies, uma vez que estudos similares realizados com outras espécies de peixes mostram resultados distintos. Em juvenis e pré-adultos de tilápia *Oreochromis niloticus*, submetidos à 5 mg/L de extracto aquoso de alho adicionado na ração durante 1 h, não foram encontradas lesões branquiais significativas, alteração da atividade opercular e houve sobrevivência total dos organismos testados (Perera & Pathiratne 2005).

Por outro lado, corroborando os resultados deste estudo, banhos de 100 mg/L de extracto aquoso de alho em “tambaqui” *Colossoma macropomum* não causaram nenhum tipo de estresse aos peixes em 30, 60 e 120 minutos de duração, mostrando que, banhos terapêuticos de extrato aquoso de alho, como indicadores de estresse, são recomendados e não comprometem a homeostase dos tambaquis nesta concentração (Araújo *et al.* 2004).

Os resultados deste estudo mostram que na medida em que é aumentada a concentração de extracto aquoso de alho a que foram expostos os juvenis, aumentam tanto as lesões histológicas das brânquias como a ocorrência de alterações morfológicas ou comportamentais.

6. CONCLUSÃO

Dentre as concentrações (10mlt/L, 12,5mlt/L e 15mlt/L), a concentração de 10mlt/L demonstrou-se ser a melhor concentração diferente de 12,5mlt/L e 15mlt/L.

Após a exposição dos animais ao extrato aquoso de alho, os animais de 10mlt/L apresentaram um comportamento anormal, sendo que passado algum tempo se estabilizaram,

Na concentração de 10mlt/L os órgãos histológicos não sofreram nenhuma alteração morfológica e apresentaram um padrão normal; diferentemente das concentrações 12,5mlt/L e 15mlt/L que antes do início da mortalidade os animais começaram a apresentar uma natação errática, boquejamento na superfície da água, seguida a mortalidade. Histologicamente os animais apresentaram brânquias e músculos danificados por estarem em contacto com substâncias que tenham uma capacidade de agressão aos seus tecidos.

A concentração de 15mlt/L do extrato aquoso de alho é a que causou mais mortalidade, sem nenhuma taxa de sobrevivência, diferente de 12,5mlt/L que apresentou uma mortalidade menor e uma taxa de sobrevivência menor mortalidade e a concentração de 10mlt/L foi a melhor concentração por não apresentar nenhuma mortalidade e 100% de sobrevivência. A concentração letal de extrato aquoso de alho foi de 15mlt/L e de 12,5mlt/L

7. RECOMENDACOES

Neste trabalho foram demonstrados resultados de sobre as concentrações letais do extrato de alho em juvenis da tilapia nilotica, tendo verificado assim que os juvenis da tilapia nilotica não toleram elevados níveis de concentração do extrato de alho, estudos mais aprofundados devem ser executados para avaliar as concentrações letais do extrato de alho para tilápia de Moçambique, para um uso potencial dos banhos terapêuticos alternativos. Recomenda-se o uso da concentração de 10ml/l do extrato aquoso de alho nos banhos terapêuticos dos juvenis da tilapia nilotica.

Recomendar a comunidade em geral para que façam o mesmo estudo com animais de fases diferentes a que teve-se neste trabalho porque os efeitos do extrato aquoso de alho no peixe pode variar em fases.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANA, L. V. 2004, "Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura". Florianópolis: UFSC.
- FAO. El Estado Mundial de La Pesca y La Acuicultura. Rome, 2010.
- GOMES, V. T. L. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana da *Myracroduonurundeuva* Fr. ALL. 2011. 40 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2011.
- HANDA S. S.; HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Trieste: ICS Unido. 2008. p. 266.
- LIMA JUNIOR, A. F. Efeito de diferentes extratos vegetais no controle de *Anthoscelidessobtectus* e *Sitophilus* sp. 2011. 67f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – UEG. Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2011.
- LIMA, A.F.; BERGAMIN, G.T.; MORO, G.V. Engorda de peixes. In: EMBRAPA. Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 440 p.
- MACHADO, L.A., SILVA, V.B., OLIVEIRA, M.M. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. *Biológico*, São Paulo, v.69, n.2, p.103-106, 2007.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERGN, ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*. v. 25, n. 3, p. 429-38, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>. Acesso em 04 maio 2015.
- MARCHIORI, V.F. Propriedades funcionais do alho (*Allium sativum* L.). Disponível em <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/alho_revisado.pdf> Acesso em: 29 julho, 2015.
- MARTINS, K. C.; PEREIRA, T. N. S.; SOUZA S. A. M.; COSTA, F. R. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. *Ciência Rural*, v. 40, n. 8, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0103-84782010000800012>>. doi: 10.1590/S0103-84782010000800012
- MEDEIROS F. H. V.; MONTEIRO F. P. Perspectivas do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2015. 360p. In: Ciências agrárias – Tecnologias e perspectivas. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.12702/978-85-68205-03-7.9>>.

- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. Doença de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3a ed. Maringá: UEM, 2008.
- RIBEIRO, C. S.; MOREIRA, R. G. Fatores ambientais e reprodução dos peixes, *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos*. 1ª Edição. Brasília, DF: Ed. Embrapa, 2013. p.301-336. *Biologia*, n.8, p.58-61, 2012.
- SANTOS, F.C.C.; VOGEL, F.S.F.; MONTEIRO, S.G. Efeito do suco de alho (*Allium sativum* L.) sobre endoparasitas gastrintestinais de ovinos. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 6, p. 176-181, 2011.
- SILVA, M. B.; ROSA, M. B.; BRASILEIRO, B. G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C. C. A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JR., T. J.; PALLINI, A. (Eds.). *Controle alternativo de pragas e doenças*. Viçosa: EPAMIG/CTZM, 2005. p.221- 246.
- SOUZA, L. S. S. Extractos aquosos de alho (*Allium sativum* L.) e sisal (*Agave sisalanan* Perrine) no controle de *Aspergillusnigere* da podridão vermelha do sisal. 91f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavoda Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Área de Concentração: Fitotecnia. Cruzdas Almas, Bahia, 2010.

9. APÊNDICES

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Regressão	1	37,5	37,5000	58,33	0,000
Erro	7	4,5	0,6429		
Total	8	42,0			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)
0,801784	89,29%	87,76%

Cálculos de taxa de sobrevivência

$$TS(\%)t1 = \frac{15}{15} \times 100 = 1 = 100\%$$

$$TS(\%)t2 = \frac{9}{15} \times 100 = 0,6 = 60\%$$

$$TS(\%)t3 = \frac{0}{15} \times 100 = 0$$

Caculo da mortalidade acumulada

$$TSAc(72h) = \frac{24}{45} \times 100 = 0,53 \times 100\% = 53\% \text{ mortes acumuladas}$$

10. ANEXOS



Figure 1: Esmagamento do alho



Figure 2: destilação da água



Figure 3: pesagem



Figure 4: medição da água



Figure 5: extracção de extrato



Figure 6: delineamento experimental

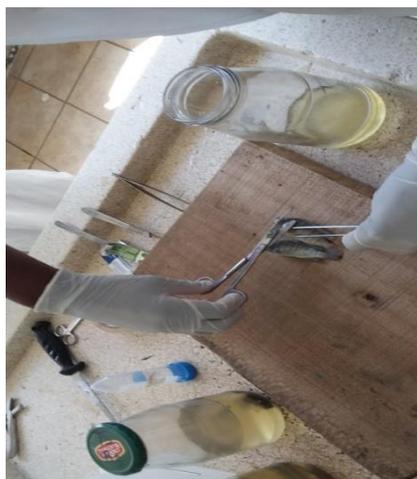


Figure 7: extracção das amostras