



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

RUDI DE CARVALHO BAGÉ

**EFEITOS DOS ANTICOAGULANTES HEPARINA E Na₂EDTA NAS ANÁLISES
HEMATOLÓGICAS DE CARPA CAPIM (*Ctenopharyngodon idella*)**

**Uruguaiana-RS
2017**

RUDI DE CARVALHO BAGÉ

**EFEITOS DOS ANTICOAGULANTES HEPARINA E Na₂EDTA NAS ANÁLISES
HEMATOLÓGICAS DE CARPA CAPIM (*Ctenopharyngodon idella*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Tecnólogo em Aquicultura.

Orientador: Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku Neis

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Aquio Hoshiba

**Uruguaiiana-RS
2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
Pelo (a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

B144e BAGÉ, Rudi De Carvalho.

EFEITOS DOS ANTICOAGULANTES HEPARINA
E Na₂EDTA NAS ANÁLISES HEMATOLÓGICAS DE CARPA CAPIM
(*Ctenopharyngodon idella*) / Rudi De Carvalho Bagé.

34 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) --
Universidade Federal do Pampa, AQUICULTURA, 2017.

"Orientação: Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku
Neis".

1. 1. carpa capim. 2. hematócrito. 3. hemoglobina. 4.
Sangue. I.
. Título.

RUDI DE CARVALHO BAGÉ

**EFEITOS DOS ANTICOAGULANTES HEPARINA E Na₂EDTA NAS ANÁLISES
HEMATOLÓGICAS DE CARPA CAPIM (*Ctenopharyngodon idella*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Tecnólogo em Aquicultura.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: dia, mês e ano.

Banca examinadora:

Prof. Dr^a. (ALESSANDRA S. K. TAMAJUSUKU NEIS)
Orientador
(UNIPAMPA)

Prof. Dr (ANTÔNIO CLEBER DA SILVA CAMARGO)
(UNIPAMPA)

Prof. Dr^a. (VANESSA BLEY RIBEIRO)
(UNIPAMPA)

Dedico este trabalho aos pilares da minha vida, obrigado meu Deus, por minha família.

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter proporcionado saúde e por ter posto pessoas tão admiráveis em meu caminho, que serviram de exemplo nos momentos de dificuldades.

A Prof^a. Dr^a. Alessandra S. K. Tamajusuku Neis, por ter aceitado ser minha orientadora, pelo apoio em todo o processo acadêmico, e principalmente pelo exemplo de dedicação a educação, muito obrigado pelo tempo doado para realização deste trabalho, eu não poderia ter tido melhor exemplo.

Agradecimento em especial aos Professores Doutores: Raquel S. Barro, Márcio Hoshiba, Antônio Camargo, Fabio de A. Pedron, Marco Aurélio de Souza, Marcos M. Querol, Viviani Corrêia e Carlos Frederico Ceccon, muito obrigado pelo conhecimento passado, pelos momentos de descontração e pela amizade.

Aos técnicos de laboratório Alexandra Pretto e Cristiano Stefanello, obrigado por cederem seu tempo na contribuição deste trabalho.

As equipes de Laboratório de Aquariorfilia e Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica 411 da UNIPAMPA, campus de Uruguaiana, Rio Grande do Sul.

Ao corpo docente do curso de Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, obrigado por todo o conhecimento passado.

Aos colegas que contribuíram de formas distintas para a realização deste trabalho de conclusão, aos amigos que sempre estarão em minhas lembranças, e não menos importante, aos meus pais, pelo apoio e pelo exemplo de caráter, obrigado a todos.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com elas acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”.

Fernando
Pessoa

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito da heparina 100 e 5.000 UI, e Na₂EDTA nas concentrações de 5 e 10%, sobre a coagulação sanguínea, parâmetros hematológicos e glicose plasmática de Carpa capim. Foram utilizados 12 peixes, com peso médio de 413,75 ± 32,38 g e comprimento total médio de 33,73 ± 0,93 cm, para coleta das amostras sanguíneas e determinação do percentual do hematócrito, concentração de hemoglobina e dosagem de glicose. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os resultados encontrados indicaram que a heparina sódica, não foi eficiente para inibição da coagulação e na ocorrência de hemólise, pois não conservou as amostras por um período superior a 10 horas. O sangue heparinizado, também demonstrou diferença significativa ($P > 0,05$) nas análises de hemoglobina e glicose, possivelmente por consequência da coagulação. O plasma sanguíneo com heparina apresentou aspecto gelatinoso posterior ao armazenamento em temperatura de 2 a 8 °C. Dessa forma, esse anticoagulante deve ser utilizado em procedimentos hematológicos rápidos e que não demandem o armazenamento do sangue para análises posteriores. O EDTA apresentou melhores resultados, visto que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as análises nos resultados de hematócrito, hemoglobina, glicose e por conservar as amostras por mais de 10 horas. Porém é importante ressaltar que os tratamentos EDTA controle e EDTA 5% demonstraram discreta ocorrência de coagulação, sendo a concentração de EDTA 10% a mais segura. Portanto, o Na₂EDTA é mais recomendado para carpa capim, uma vez que este tratamento apresentou a menor taxa de alterações no sangue armazenado.

Palavras-Chave: carpa capim, hematócrito, hemoglobina, glicose, sangue.

ABSTRACT

The present study evaluated effect of heparin 100 and 5,000 IU, and Na₂EDTA at concentrations of 5 and 10%, on blood coagulation and hematological parameters of Grass carp. Twelve fish were used, with a mean weight of 413.75 ± 32.38 g and mean total length of 33.73 ± 0.93 cm, to collect blood samples and determine percentage of hematocrit and hemoglobin and glucose concentration. The data were submitted to analysis of variance, and the means were compared by the Tukey test, at 5% probability. Results indicated that sodium heparin was not efficient for coagulation inhibition and hemolysis occurrence, because it did not conserve samples for a period more than 10 hours. Heparinized blood also showed a significant difference ($P > 0.05$) in hemoglobin and glucose analyzes, possibly due to coagulation. Plasma with heparin presented a gelatinous appearance after storage at a temperature of 2 to 8 ° C. Therefore, this anticoagulant should be used in rapid hematological procedures but not for further analysis. EDTA presented better results, since there was no significant difference ($P > 0.05$) in the results of hematocrit, hemoglobin, glucose and for preserving the samples for a longer period of time. However, it is important to note that EDTA control and 5% EDTA treatments showed a slight occurrence of coagulation, with 10% EDTA concentration being the safest. Therefore, Na₂EDTA is more recommended for grass carp, since this treatment presented the lowest rate of alterations in stored blood.

Key-words: grass carp, hematocrit, hemoglobin, glucose, blood.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ação dos diferentes anticoagulantes na cascata de coagulação sanguínea	15
Figura 2 – Espécie <i>Ctenopharyngodon idella</i>	15
Figura 3 – Amostras de sangue coletadas da carpa capim, retiradas da veia caudal e transferidas para tubos sem anticoagulante.....	20
Figura 4 – Amostras de sangue acondicionado em <i>eppendorfs</i> contendo anticoagulante EDTA.	22
Figura 5 – Amostras de sangue acondicionado em <i>eppendorfs</i> contendo anticoagulantes.	23
Figura 6 – Amostras do plasma sanguíneo acondicionado em <i>eppendorfs</i>	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Divisão dos animais em grupos e biometrias correspondentes.....	21
Tabela 2 – Valores médios das características hematológicas de carpa capim da espécie <i>Ctenopharyngodon idella</i> , sob a influência dos anticoagulantes heparina e EDTA.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTPA - Centro de Tecnologia em Pesca e Aquicultura

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

K₃EDTA- - ácido etilenodiamino tetra-acético potássico

Na₂EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético sódico

Hct - Hematócrito

Hb – Hemoglobina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO GERAL	20
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Animais	21
3.2 Coletas Sanguíneas e Biometrias	21
3.3 Parâmetros Hematológicos	22
3.3.1 Hematócrito	22
3.3.2 Dosagem de Hemoglobina	22
3.4 Parâmetro Bioquímico	22
3.4.1 Dosagem de Glicose	22
3.5 Análises Estatísticas	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
6 REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado em 2012 foi de 158 milhões de toneladas, dos quais 136,2 milhões de toneladas foram para o consumo humano acarretando em um recorde na produção de pescado per capita, com 19,2 kg de pescado por habitante (FAO, 2014). De acordo com a FAO (2013), é previsto que até 2030 a demanda internacional de pescado aumente em mais 100 milhões de toneladas por ano. Segundo os dados oficiais do Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção brasileira de pescado em 2013 foi de 1.241.807 toneladas, sendo que, destas, 765.287 toneladas foram de origem da pesca (61,6%) e 476.512 toneladas de origem da aquicultura (38,4%), segundo o PLANO DE DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA (PDA, 2015).

A aquicultura vem destacando-se nas últimas décadas com um crescimento médio anual de 15%. A atividade tem possibilitado o desenvolvimento socioeconômico de diversas regiões, criando empregos e fixando os pescadores artesanais na comunidade (CAMARGO *et al.*, 2016). O Brasil, por possuir as maiores bacias hidrográficas e a maior diversidade de peixes continentais do planeta, dispõe de ótimas oportunidades para o desenvolvimento da piscicultura, atividade que pode gerar empregos, renda, e principalmente contribuir para o aumento do consumo de peixe, que são importantes fontes de proteínas para a alimentação.

A piscicultura é um ramo da aquicultura que entre os seus objetivos, está a produção de peixes em cativeiro, que cresce ano a ano contribuindo com boa parte da produção mundial de peixes, e como qualquer atividade de cultivo tem como meta alcançar uma alta produtividade (BATISTA, 2013). No entanto é importante ressaltar que para uma determinada espécie ser utilizada em piscicultura, deve-se avaliar a biologia do animal e seu desempenho frente a manejos intensivos, sendo um fator importante para o sucesso da criação (RANDUZ NETO *et al.*, 2006).

Nesse sentido, Ishikawa *et al.*, (2010a) sugerem o monitoramento do estado de saúde dos peixes por meio da hematologia clínica como uma ferramenta para a realização de diagnóstico de patologias. Além disso, a hematologia é um indicador prognóstico das condições patológicas, especialmente quando se considera as alterações morfológicas nas células sanguíneas. Conforme Tavares-Dias *et al.*, (1999), parâmetros hematológicos de peixes podem ser de grande valia em

pisciculturas, uma vez que podem ser utilizados como indicadores do seu estado fisiológico, assim como no controle de patologias e estresse de manipulação. O sangue é composto de uma parte líquida e outra celular, os componentes da parte líquida, denominada plasma, constituído por água, proteínas, glicose, sais minerais e outros nutrientes que são obtidos após centrifugação desde que seja coletado com o uso de anticoagulante, e contém o fibrinogênio (MOLINARO *et al.*, 2010; PRADO *et al.*, 2016). Na ausência de anticoagulantes, o fibrinogênio, juntamente com os outros elementos celulares do sangue, forma um coágulo, esse processo de coagulação permite a obtenção do soro sanguíneo, que é essencialmente o plasma sanguíneo sem o fibrinogênio (MOLINARO *et al.* 2010). A parte celular é constituída de eritrócitos, leucócitos e plaquetas (PRADO *et al.* 2016).

A hemoglobina é uma proteína ajustada constituída de 96% de proteínas (globinas) e por um grupo prostético de coloração vermelho chamado heme (4%), o qual é formado por ferro e grupamentos de moléculas orgânicas (DIAZ GONZÁLEZ; SILVA, 2008), pigmento respiratório dos eritrócitos, tem por função transportar o O₂ e parte do CO₂ no sangue, cada molécula de hemoglobina contém quatro moléculas do radical heme e dois pares de cadeias de poli peptídeos, estruturalmente formadas por diversos aminoácidos permitindo à hemoglobina captar oxigênio (SILVA, *et al.*, 2012).

O termo "hematócrito" foi criado em 1903 e vem do grego *hemat-*, sangue + *krites*, julgar = julgar ou avaliar o sangue (GOMES, *et al.*, 2007). O hematócrito ou volume globular é o parâmetro utilizado para avaliar o estado de hidratação, anemia ou perda grave de sangue do corpo, assim como da capacidade do corpo para transportar oxigênio, pois ele se refere à relação entre o volume de eritrócitos e o volume total de sangue. O hematócrito é determinado após centrifugação do sangue, que separa plasma e soro (BRANDÃO, 2006), onde a dosagem de glicose pode ser realizada (SUMITA, 2014).

Com relação aos parâmetros bioquímicos, a glicose é o monossacarídeo presente em maior quantidade no sangue, onde é transportada em concentrações bem controladas e recebe o nome de glicemia (do grego *glucos* - açúcar e *hemos* - sangue), tem como principal função gerar energia na forma de ATP (adenosina trifosfato) nas células. Para tal precisa ser convertida em piruvato, através de uma via chamada de glicolítica, que faz a quebra da glicose, com o principal propósito de liberar a energia para as funções biológicas (PEGORARO *et al.*, 2011). Alterações

causadas pelo estresse fazem o organismo liberar hormônios que podem alterar o nível glicêmico podendo causar uma crise de hiperglicemia (HOSHIBA *et al.*, 2009). Em um primeiro momento, a resposta de estresse prepara o corpo para “lutar ou fugir”: glicose é mobilizada como fonte de energia; o sangue é desviado de órgãos que não são essenciais em exercícios físicos, como pele e intestinos, e ocorre aumento do fluxo sanguíneo para órgãos cruciais como coração, músculo esquelético e cérebro; a cognição é aguçada e a percepção da dor é diminuída (SERRA, 2010).

Segundo Ghirdelli *et al.*, (2006), a variação nas características hematológicas em peixes depende da espécie, idade, sexo, alimentação e ambiente a que estão expostos. O uso de anticoagulantes torna-se essencial para os procedimentos hematológicos e imunológicos, pois a hemólise está entre as principais alterações ocasionadas pela utilização de anticoagulantes inadequados (ISHIKAWA *et al.*, 2010a). A utilização de diferentes anticoagulantes na hematologia clínica de peixes, tem recebido atenção de pesquisadores (SOUZA *et al.*, 2012; WEINERT *et al.*, 2015), sendo a heparina e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) os anticoagulantes mais utilizados (PÀDUA *et al.*, 2012).

Entre a utilização destes fármacos, tem-se principalmente a heparina de sódio, heparina de lítio, EDTA disódico (Na_2EDTA), EDTA dipotássico (K_2EDTA) e o EDTA tripotássico (K_3EDTA) que por sua vez atuam em diferentes etapas da cascata de coagulação inibindo-a, preservando a fluidez do sangue que viabiliza a realização do hemograma (SOUZA, 2012). A heparina age interferindo nas etapas finais da cascata da coagulação, impedindo conversão da protrombina (fator II) em trombina, que, por sua vez, promove a conversão do fibrinogênio (fator I) em fibrina, originando o coágulo, enquanto o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é um composto orgânico que age formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos, funcionando como bloqueador do cálcio ionizado através de reações químicas com formação do complexo insolúvel EDTA-Ca, em razão dessa propriedade, o sal EDTA é usado como anticoagulante do sangue, pois ocasiona a quelatação do fator IV (Ca^{2+}) na cascata da coagulação sanguínea (SECCHI, 2010; ISHIKAWA *et al.*, 2010b; SILVA, *et al.*, 2013), conforme Figura1.

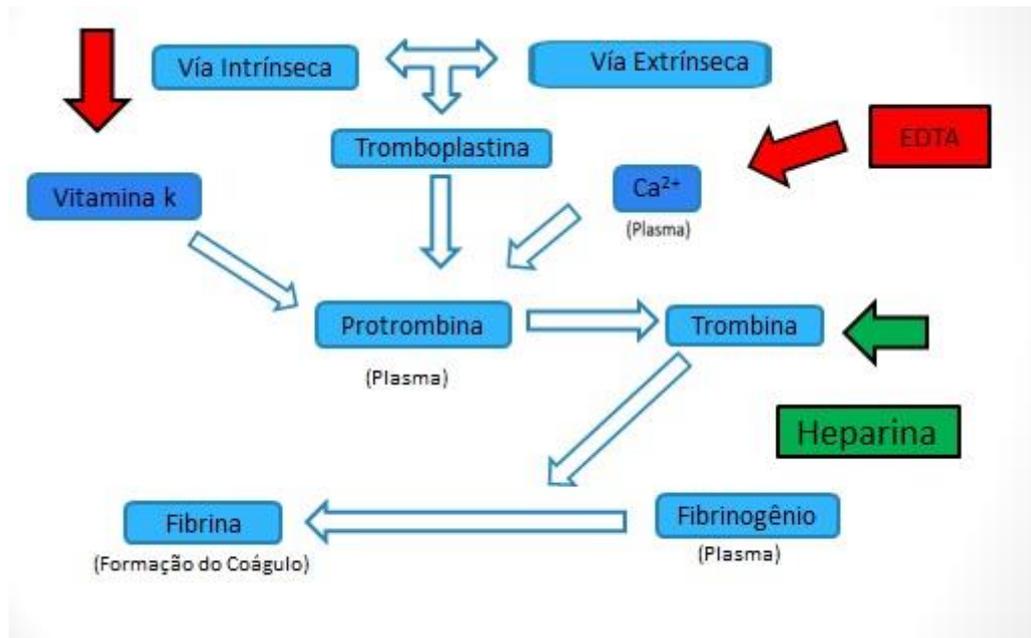


Figura 1. Ação dos diferentes anticoagulantes na cascata de coagulação sanguínea. (Adaptado de Garcés, *et al.*, 2007)

A hematologia estuda as alterações dos padrões e dos distúrbios morfológicos das células do sangue (SILVA *et al.*, 2012). Já foram realizados diversos trabalhos para analisar essas variações nos parâmetros sanguíneos de peixes (TAVARES-DIAS *et al.*, 1999; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2000; FUJIMOTO *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2015). Para se estabelecer valores hematológicos de referência, torna-se necessário o conhecimento do anticoagulante mais apropriado para cada espécie (PÁDUA, *et al.* 2012). Estudos vêm sendo realizados com diferentes espécies de peixes, para definição dessas referências, como em Oliveira *et al.*, (2015), que compararam EDTA 5 e 10%, heparina 2.500 e 5.000 UI, em arraias (*Elasmobranchii: Potamotrygonidae*) e não foram observadas diferenças significativas entre esses anticoagulantes. Entretanto, outros trabalhos apontam que a heparina sódica como o anticoagulante mais recomendado, como foi concluído por, Paduá *et al.*, (2012), que ao utilizaram K₃EDTA 10% e Heparina, 100 e 5.000 UI em tambaqui (*Colossoma macropomum Cuvier*, 1816) e, Farias *et al.*, (2016), utilizando Na₂EDTA, nas concentrações, 3% e 10%, e heparina sódica 100 e 5.000 UI em pacu (*P. Mesopotamicus*). Também, Weinert *et al.*, (2015), testando diferentes anestésicos e amostras obtidas contendo heparina 50 UI e Na₂EDTA (2 mg.mL⁻¹), constatou que a heparina sódica é mais indicada, porém, Pereira *et al.*, (2015), que utilizaram EDTA

10% e heparina 5.000 UI, afirmam melhores resultados com uso do EDTA, sendo que ambos estudaram a espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Coincidindo com os resultados encontrados por Ishikawa *et al.*, (2010b), que pesquisaram o efeito do Na₂EDTA, nas concentrações de 3, 5 e 10% e da heparina 100 UI na coagulação sanguínea e nos parâmetros hematológicos de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*), constatando o Na₂EDTA como mais indicado para a espécie. Diante disso é possível notar diferenças relacionadas à espécie, contribuindo com o fato de que os anticoagulantes devem ser avaliados para cada espécie em particular (PÁDUA *et al.*, 2012).

O peixe escolhido para este estudo é popularmente conhecido como carpa capim, da espécie *Ctenopharyngodon idella* (VALENCIENNES, 1844), conforme Figura 2.



Figura 2. Espécie *Ctenopharyngodon idella*. Fonte: Google

É uma espécie exótica amplamente utilizada na piscicultura brasileira em policultivo com outras carpas, caracteriza-se por sua rusticidade, desempenho satisfatório e grande aceitação no mercado consumidor em comparação com outras carpas (VEIVERBERG, *et al.*, 2010), contribuem com a fertilização dos tanques induzindo a formação de plâncton no meio aquático (SANTOS, *et al.*, 2003). A carpa capim é um peixe herbívoro, pertencente à família *Cyprinidae*, é nativo de grandes rios da costa leste da Ásia que desembocam no Pacífico, e inseridos em muitos locais do mundo, como na América do Sul e do Norte, Ásia, África e Austrália para o controle de macrófitas aquáticas e para aumentar a produção de peixes por meio do policultivo (SILVA, 2014). Consome plantas aquáticas, gramas e capins verde fresco (não seco), é um peixe de piracema e excelente produtor de adubo orgânico,

podendo atingir cerca de 1,8 kg com um ano de cultivo (CALDAS, 2016).

O estudo de anticoagulantes com a espécie *Ctenopharyngodon idella* (VALENCIENNES, 1844), torna se importante pela inexistência de trabalhos na literatura. Dessa forma, este estudo avaliará a eficácia da heparina de sódio e do EDTA em diferentes concentrações como anticoagulantes, bem como o efeito destes fármacos sobre os parâmetros hematológicos, hematócrito e hemoglobina, e parâmetros bioquímicos, como dosagem de glicose plasmática no sangue de carpa capim, a fim de contribuir com informações para a melhoria do cultivo da espécie.

2 OBJETIVO GERAL

Determinar a eficiência dos anticoagulantes heparina e EDTA na coleta de sangue de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar a eficácia de anticoagulantes, heparina sódica nas concentrações 100 e 5.000 UI e EDTA dissódico nas concentrações 5 e 10%, na coleta de sangue de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) por meio de análise dos parâmetros de micro hematócrito, concentração de hemoglobina e dosagem de glicose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Aquariorfilia da UNIPAMPA, campus de Uruguaiana, Rio Grande do Sul. Os animais utilizados no experimento foram disponibilizados pela Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA). Foram utilizados 12 indivíduos adultos de carpa capim da espécie *Ctenopharyngodon idella*, provenientes de tanque de cultivo, com peso médio de $413,75 \pm 32,38$ g e comprimento total médio de $33,73 \pm 0,93$ cm. Os animais foram capturados com auxílio de puçás e aclimatados em tanque de concreto recebendo ração comercial. Após uma semana os peixes foram transportados por meio de sacos plásticos de 60 litros, para um tanque de polipropileno com renovação constante de água, permanecendo em jejum, pelo período de 48 horas.

3.2 Coletas Sanguíneas e Biometrias

Após período de aclimação, os animais foram contidos manualmente por meio de um pano umedecido e submetidos à venopunção caudal de 2,0 mL, foram utilizadas seringas estéreis com volume de 5 mL e agulhas hipodérmicas, as amostras foram homogeneizadas por inversão e acondicionadas em *ependorfs*, foram armazenados em caixa de isopor com gelo. Imediatamente foi realizada a biometria, dentro de poucos segundos, de forma a minimizar os efeitos do estresse agudo provocado pela captura, conforme apresentado por Ishikawa *et al.*, (2010 a, b), após a coleta os animais não retornavam ao experimento.

Foi retirado uma alíquota com 2 mL de sangue do primeiro indivíduo usando seringa com agulha isenta de anticoagulante, para servir como amostra controle positivo. Para o restante dos animais, as seringas foram enxaguadas com a menor concentração de cada anticoagulante e acondicionadas em 3 microtubos de polipropileno, sendo 0,5 mL de sangue para cada tubo: tubo isento de anticoagulante para servir de controle EDTA, tubo contendo 15 μ L de EDTA 5% (0,5 mg mL⁻¹ de sangue), e tubo contendo 15 μ L de EDTA 10% (1 mg mL⁻¹ de sangue).

Ou no caso da heparina, um tubo isento de anticoagulante (controle heparina), e outros dois tubos contendo, 15 μL de Heparina sódica 5.000 UI (150 UI mL^{-1} de sangue) e 15 μL de Heparina 100 UI ($1,5 \text{ UI mL}^{-1}$ de sangue) após diluição realizada a partir da heparina sódica 5.000 UI em solução fisiológica a 0,9% NaCl (1:50).

3.3 Parâmetros Hematológicos

3.3.1 Hematócrito

As análises hematológicas foram realizadas, no laboratório 411 de Hematologia e Citologia Clínica da UNIPAMPA. O sangue foi acondicionado em capilares com o preenchimento de 3/4 do volume do tubo capilar, uma das extremidades foi vedada e foi procedida a centrifugação, tomando o cuidado de colocar a parte vedada para fora. A centrífuga de micro hematócrito foi operada a 1.000 rpm, durante 10 minutos seguida de leitura de tabela apropriada conforme sugerido por Goldenfarb *et al.*, (1971).

3.3.2 Dosagem de Hemoglobina

As análises para a dosagem de hemoglobina, foram feitas no Laboratório de Bioquímica do curso de Farmácia da UNIPAMPA. Em cada tubo de ensaio foi pipetado 5,0 ml de reativo de Drabkin (marca Doles®) e 20 μL de sangue (homogeneizado), seguido de Incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente. A dosagem nas amostras foi realizada em triplicata e as leituras das absorbâncias feitas no espectrofotômetro em 510 nm (FEMTO 800 XI®), zerando o aparelho com água destilada.

3.4 Parâmetro Bioquímico

3.4.1 Dosagem de Glicose

As amostras sanguíneas foram colocadas em centrífuga (centrífuga 5415 R), para *ependorfs*, durante 10 minutos a 2400 rpm, temperatura de 4°C. Após a centrifugação, o plasma foi separado do sangue e armazenado em isopor com gelo

a uma temperatura de 2 a 8 °C, sendo realizado dosagem de glicose 48 horas depois. A dosagem de glicose foi realizada através de kit comercial de glicose enzimática líquida (marca Doles[®]), sendo usado o plasma que foi separado através centrifugação do sangue. Foi pipetado 10 µL da amostra em tubo de ensaio e adicionado o reagente de cor e misturado por agitação e incubado por 5 minutos em banho maria, a 37°C. Então realizada a leitura em triplicata das absorbâncias em espectrofotômetro a 510 nm.

3.5 Análises Estatísticas

Os resultados foram avaliados por meio do procedimento GLM do SAS Software, versão 2001 (SAS Institute, Cary, NC, EUA), expressos em média ± erro padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, sendo $p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro indivíduo, com o peso de 371,50 gramas de peso e 32,50 cm de comprimento total, quando retirado uma alíquota de 2 ml sangue com agulha isenta de anticoagulante, e transferido para o *ependorf*, o sangue controle rapidamente formou coágulos, demonstrado na Figura 3.

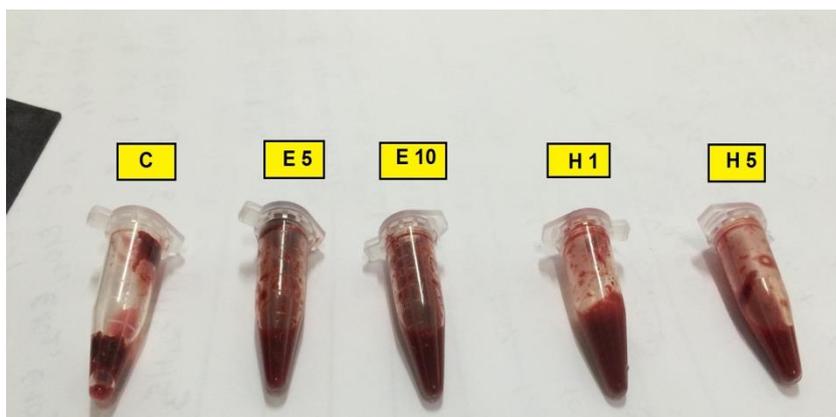


Figura 3. Amostras de sangue coletadas da carpa capim, retiradas da veia caudal e transferidas para tubos sem anticoagulante - controle (C), contendo EDTA 5% (E5), EDTA 10% (E10), Heparina 100UI (H1), Heparina 5.000UI (H5). Fonte:Autor

Para o restante dos animais foi decidido usar a menor concentração de anticoagulantes possível e usadas seringas lavadas com anticoagulantes (EDTA 5% e heparina 100UI). A divisão dos animais e os resultados das biometrias estão expressos na Tabela1.

Tabela1- Valores médio de Peso (g), Comprimento Total (CT), número de animais por grupo (n) nos diferentes tratamentos

Grupo	Peso (g)	CT (cm)	n
Controle	371,39	32,5	1
EDTA*	421,93 ± 65,56	33,80 ± 1,57	5
Heparina	413,97 ± 40,95	33,88 ± 1,45	6

*ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Valores nos grupos EDTA e Heparina representam média ± desvio padrão.

Os resultados dos parâmetros hematológicos para carpa capim no presente estudo estão de acordo com os encontrados na literatura (YILDIZ & UZBILEK, 2001; ZHENG *et al.*, 2012). Dos anticoagulantes utilizados, o EDTA apresentou melhores resultados em relação à inibição da coagulação e na ocorrência de hemólise para

Ctenopharyngodon idella, visto que não houve diferença significativa ($P>0,05$) nos resultados de hematócrito, hemoglobina, glicose (Tabela 2) e por conservar as amostras por mais de 10 horas. Porém é importante ressaltar que os tratamentos EDTA controle e EDTA 5% demonstraram discreta ocorrência de coagulação, quando comparado ao EDTA 10% (figura 4).

Tabela 2. Valores médios das características hematológicas de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), Sob a influência dos anticoagulantes heparina e EDTA.

Tratamentos	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	Glicose (mg/dL)
EDTA C	37,70±1,53 ^a	9,86±0,39 ^a	95,86±7,39 ^a
EDTA 5%	34,31±1,17 ^a	10,23±0,50 ^a	92,93±5,19 ^a
EDTA 10%	33,18±1,87 ^a	9,98±0,74 ^a	105,92±3,55 ^a
Heparina C	32,41±0,78 ^a	8,65±0,57 ^b	103,53±8,00 ^b
Heparina 100UI	35,34±2,87 ^a	9,78±0,31 ^{ab}	118,12±5,33 ^b
Heparina 5.000UI	29,61±1,23 ^a	10,44±0,48 ^a	116,60±8,46 ^b

Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma coluna diferem de acordo com o teste de Tukey ($P<0,05$). EDTA C (EDTA controle), Heparina C (Heparina controle).

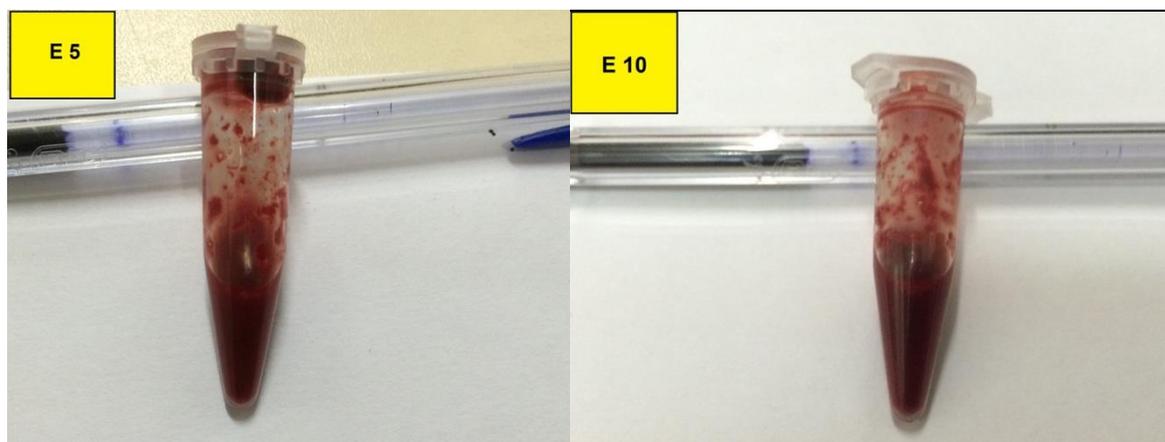


Figura 4. Amostras de sangue acondicionado em eppendorfs contendo anticoagulante EDTA. E 5 (EDTA 5%), E 10 (EDTA 10%). Fonte: Autor

O grupo heparina apresentou diferenças significativas nas análises feitas com hemoglobina e glicose, conforme a Tabela 2. Nas amostras sanguíneas acondicionadas com heparina foi observada de discreta a moderada coagulação (Figura 5). Na hemoglobina Possivelmente as diferenças encontradas com o anticoagulante heparina são explicadas pela taxa de coagulação, indicando que

quanto maior a concentração usada desse anticoagulante, menor será a formação de coágulos não interferindo na dosagem de hemoglobina. De acordo com Hattingh (1975), quando a heparina é utilizada em baixas concentrações a ocorrência de coagulação do sangue acaba acontecendo dentro de poucos minutos após a coleta.

Nos resultados da Glicose, houve ainda coagulação no plasma, apresentando aspecto viscoso com o aparecimento de pequenos pedaços sólidos gelatinosos, como pode ser observado na figura 6. Provavelmente essa viscosidade do plasma implica nas alterações dos resultados da glicose na heparina em comparação com o EDTA (Tabela 2). Alves, (2013), ao testar, 50µl de EDTA-K₃ a 10% e 100µl de heparina sódica, no plasma sanguíneo de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), constatou não haver diferença estatística nos níveis de glicose com o uso de ambos anticoagulantes. Tavares-Dias & Sandrim (1998), utilizaram EDTA fluoretado para dosagem da glicemia e EDTA 10% para o hemograma e dosagem do cortisol plasmático em *Colossoma macropomum*, como anticoagulante padrão. O anticoagulante ideal para análises de glicose é o fluoreto de sódio, que inibe a glicólise anaeróbica pelos eritrócitos (ALVES, 2013).

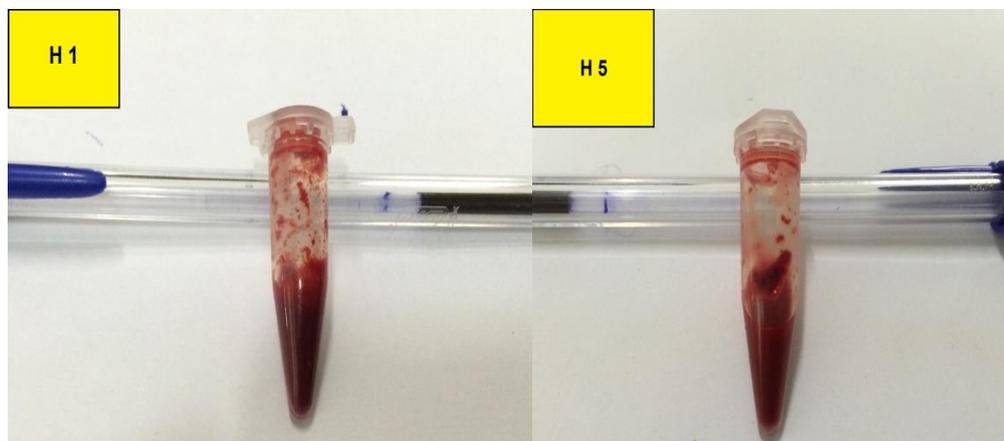


Figura 5. Amostras de sangue acondicionado em eppendorfs contendo anticoagulantes. H1 (Heparina 100UI), H5 (Heparina 5.000UI). Fonte:Autor

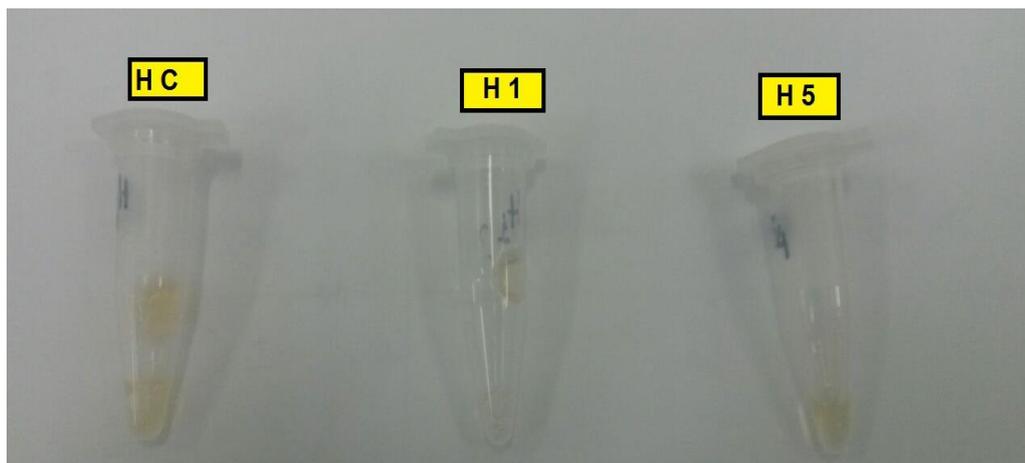


Figura 6. Amostras do plasma sanguíneo acondicionado em eppendorfs, HC (controle heparina), H1 (Heparina 100UI) (H1), Heparina 5.000UI (H5). Fonte:Autor

Os resultados do presente estudo, corroboram com os observados por Ishikawa *et al.*, (2010b) em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*), que pesquisam o efeito do Na₂EDTA, nas concentrações de 3, 5 e 10% e da heparina 100 UI, e constataram que a heparina não foi eficiente para preservação do sangue, ocorrendo coagulação das amostras, não houve diferenças significativas no hematócrito com o Na₂EDTA, sendo o mais indicado para a espécie. Resultados semelhantes foram encontrados, por Yoshioka *et al.*, (2012), que analisaram o efeito EDTA dissódico (Na₂EDTA) nas seguintes concentrações 3, 5 e 10%, sobre as variáveis hematológicas do híbrido tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*), concluindo não ocorrer diferenças significativas nos parâmetros hematócrito e concentração de hemoglobina e que o EDTA dissódico pode ser utilizado em qualquer das concentrações avaliadas. Também em, Pereira *et al.*, (2015), ao utilizarem Na₂EDTA 10% e heparina 5.000 UI, em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), verificaram não ter diferenças significativas entre os anticoagulantes, porém, o Na₂EDTA foi mais eficiente na preservação das amostras. Já Weinert *et al.*, (2015), ao testar heparina 50 IU e Na₂EDTA (2 mg•mL⁻¹) constatou menor hemólise com o tratamento heparina, sendo que ambos estudaram a mesma espécie. Farias *et al.*, (2016), utilizando Na₂EDTA, nas concentrações, 3% e 10%, e heparina sódica 100 e 5.000 UI em pacu (*P. Mesopotamicus*), e Paduá *et al.*, (2012), que ao utilizarem K₃EDTA 10% e Heparina, 100 e 5.000 UI em tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816), constataram a heparina como anticoagulante de maior eficiência para análises hematológicas para as respectivas espécies. Entretanto, para jundiá (*Rhamdia quelen*) (HIGUCHI *et al.*, 2011) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (FRIES *et al.*, 2016) não foram verificados

alterações ao usar EDTA 10% para análises de parâmetros hematológicos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), sendo os resultados de hematócrito, hemoglobina e glicose, semelhantes aos encontrados no presente estudo com , o EDTA a 10%.

Os resultados das análises diferenciaram-se, possivelmente, pelo modo de ação dos respectivos anticoagulantes, já que a heparina evita a coagulação sanguínea por interferir especificamente com a conversão da protrombina em trombina, enquanto o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é um composto orgânico que age formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos. Em razão dessa propriedade, o sal EDTA é usado como anticoagulante do sangue, pois quela os íons de cálcio, que promovem a coagulação sanguínea (SILVA *et al.*, 2013).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, a heparina sódica não foi eficiente para inibição da coagulação e na ocorrência de hemólise. Isto pode ser atribuído a não conservação das amostras por um período superior a 10 horas. Desta forma, esse anticoagulante deve ser utilizado em procedimentos hematológicos rápidos e que não demandem o armazenamento do sangue para análises posteriores.

O EDTA dissódico (Na_2EDTA) demonstrou melhores resultados, visto que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as análises nos resultados de hematócrito, hemoglobina, glicose e por conservar as amostras por mais de 10 horas, mostrando-se eficiente na inibição de coágulos, portanto, deve ser considerado que utilizar o EDTA 5% torna a avaliação segura e economicamente viável. Entretanto, o grupo EDTA 5% apresentou discreta coagulação, o que sugere que não haverá problemas se usado em baixas concentrações para análises rápidas, sendo a concentração de EDTA 10% a mais segura. Portanto, o Na_2EDTA é o anticoagulante mais indicado para carpa capim nesta fase de vida, uma vez que este fármaco apresentou a menor taxa de alterações no sangue armazenado. Por fim, é importante garantir mais estudos para estabelecer valores de referência, pois os anticoagulantes devem ser avaliados para cada espécie em particular.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, G. M. **Efeitos dos anticoagulantes – citrato de sódio, EDTA-K3e heparina sódica nas análises hematológicas e bioquímicas em Araras Canindé (*Ara ararauna*), Tigre d'água (*Trachemys scripta*) e Pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*)**. Dissertação (Universidade Federal de Minas Gerais). Belo Horizonte, MG, Brasil. Março de 2013.

BATISTA, A. **A Contribuição da Piscicultura para as Pequenas Propriedades Rurais Em Dourados – MS**. Dissertação (Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Administração. Dourados, MS, Brasil. p. 14. 2013.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L. de C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Revista Acta Amazônica**. Manaus, AM, Brasil. VOL. 36(3) 2006: pg. 351. 2006.

CALDAS, M, E, M, R. **Criação Racional de Peixes**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/Artigos/artigo14.htm>>. 15-08-2016. Acesso em: Set 2016.

CAMARGO, A. C. S., *et al.* **Piscicultura Aspectos Relevantes**. Uruguaiana, RS: Unipampa. P. 80., 415 p.: 2016

DIAZ, G.; SILVA, F. H. **Patologia Clínica Veterinária: Texto Introdotório**. Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS. Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Brasil. p. 12. 2008

DRUMOND, G. V. F. *et al.* Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (*Arapaimidae*) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. **Revista Acta Amazônica**. VOL. 40(3) 2010: 591 – 596. Manaus, Amazonas, Brasil. 2010.

FAO, 2013. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS . **Fishery and Aquaculture Statistics**. Rome. 2013.

FAO, 2014. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and challenges**. Rome. 2014.

FARIAS, T. H. V. *et al.* Na₂EDTA anticoagulant impaired blood samples from the teleost *Piaractus mesopotamicus*. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**

36(5):431-435, Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP, Brazil. 2016.

FUJIMOTO, R.Y. *et al.* Parâmetros sanguíneos de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com cromo trivalente em duas densidades de estocagem. **Acta scientiarum. Animal sciences**, v.29, n.4. 2007.

FRIES, E. M. Avaliação dos parâmetros hematológicos do pacu *Piaractus mesopotamicus* infectado por *lernea* spp. **Revista Cultivando o Saber**. Volume 9 - n° 4, p. 479 a 485. Paraná, Brasil. Outubro a Dezembro de 2016.

GHIRALDELLI, L. *et al.* Hematologia de *Oreochromis niloticus* (*Cichlidae*) e *Cyprinus carpio* (*Cyprinidae*) mantidos em diferentes condições de manejo e alimentação no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Acta Science** . Biol. Sci. Maringá, v. 28, n. 4, p. 319-325, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Oct./Dec., 2006

GOMES, K. R. *et al.* Avaliação do Hematócrito e da Proteína Plasmática Em Sangues Hemodiluídos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** – ISSN: 1679-7353. Editora FAEF. Ano V – Número 09 – Julho de 2007 – Periódicos Semestral.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**.v. 56, n. 1, p.35-39, jul. 1971.

HATTING, J. Heparin and Ethylenediamine Tetra-Acetate as Anticoagulants for Fish Blood. Springer-Verlag. Department of Zoology, Rand Afrikaans University, Johannesburg, South Africa. **Pfliigers Arch**. 355, 3&7—352. 1975.

HIGUCHI, L. H. *et al.* Avaliação Eritrocitária e Bioquímica de Jundiás (*Rhamdia Quelen*) Submetidos à Dieta com Diferentes Níveis Protéicos e Energéticos. **Revista Ciência Animal Brasileira**., Goiânia, v. 12, n. 1, p. 70-75, Brasil. 2011.

HOSHIBA, M. A.; GONÇALVES, F. D.; URBINATI, E. C. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. **Revista Acta Amazônica**. vol. 39(2) 2009: 445 – 452. 2009.

ISHIKAWA, M. M. *et al.* Procedimentos básicos para colheita de sangue em peixes. **Circular Técnica Embrapa**, 17. Embrapa Agropecuária Oeste, 8. Dourados, MS Julho, 2010a.

_____. Heparina e Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.7, p.1557-1561, jul, 2010b

MOLINARO, E.; CAPUTO, L. F. G.; Amendoeira, Maria Regina R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**: volume 2 / - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 290 p. : il. , tab. ISBN: 978-85-98768-41-0. pág. 73. 2010.

OLIVEIRA, A. T. *et al.* Comparação dos efeitos de anticoagulantes usados na colheita sanguínea para a determinação dos parâmetros do sangue em arraiais de vida livre do gênero *Potamotrygon* (*Elasmobranchii: Potamotrygonidae*). **Revista Biota Amazônia**. Macapá, v. 5, n. 3, p. 55-58, 2015

PÁDUA, S. B. *et al.* Heparina e K₃EDTA como anticoagulantes para tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816). **Revista Acta Amazônica**. vol. 42(2) : 293 – 298. SP. 2012.

PEGORARO, N. C. C. *et al.* Estudo comparativo da glicemia em soro e em plasma de pacientes atendidos pelo laboratório da Faculdade de Medicina do ABC. **Revista Brasileira de Farmácia**. 92(1): 9-12. Santo André, SP, Brasil. 2011.

PEREIRA, D. S. P. *et al.* Comparação de metodologias utilizadas na análise dos parâmetros sanguíneos e da proteína total de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.16, n.4, p.893-904 . Salvador, Bahia, Brasil. out./dez., 2015.

Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira 2015-2020 (PDA). Brasília, DF . p, 10. Disponível em: <http://seafoodbrasil.com.br/wp-content/uploads/2015/09/Plano_de_Developolvimento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf>. Acesso em: 1 dez. 2016.

PRADO, R. R. *et al.* Eritrograma em Medicina Veterinária. **PUBVEST. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.10, n.1, p.61-82, Jan., 2016

RANDUZ NETO, J. *et al.* Alimentação da piava (*Leporinus obtusidens*) com diferentes fontes proteicas. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1611. Santa Maria, RS, Brasil. set-out, 2006.

RANZANI PAIVA, M. J. T. *et al.* Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of the upper. **Acta Scientiarum Magazine**. 22(2):507-513, 2000. Maringá-Paraná, Brazil. 2000.

SANTOS, A. B. *et al.* Criação de Carpa Capim *Ctenopharyngodon Idella*, Alimentadas com Sementes De Capim Arroz *Echinochloa Sp.* **Revista da FZVA**. v. 10, n. 1, p. 171-185. Uruguaiana, RS, Brasil. 2003.

SECCHI, P. Bioquímica dos Conservantes Sanguíneos. **Anais...** Seminário apresentado na disciplina Bioquímica Do Tecido Animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

SERRA, M. **Elevação plasmática do cortisol aumenta a agressividade em juvenis de matrinxã, Brycon amazonicus**. Dissertação (Universidade Estadual Paulista). JABOTICABAL , SÃO PAULO, BRASIL. p. 11. 2010.

SILVA, A. S. E.; Lima J. T. A. X.; Blanco B. S. Hematologia Em Peixes. (Revisão Bibliográfica). Publicação do Conselho Regional de Medicina Veterinária. **Revista Centauro**. v.3, n.1, p 24-32. Rio Grande do Norte. 2012. Versão On-line ISSN 178-7573 <http://www.crmvrn.gov.br>.

SILVA, A, F. **Preferência Alimentar e Eficiência da Carpa Capim (*Ctenopharyngodon Idella*) no Controle de Macrófitas Aquáticas em Mesocosmos**. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal. São Paulo, BRASIL. p. 2. 2014.

SILVA, S. B. *et al.* Análise Comparativa de Hemogramas de Ratas Submetidos aos Anticoagulantes EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) e Heparina. **Anais... XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2013 – UFRPE**: Recife, Pernambuco. 09 a 13 de dezembro. 2013.

SOUZA, F. C. *et al.* Heparina e EDTA como Anticoagulantes para Matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Anais...** I Encontro Nacional De Aquicultura Na Amazonia. pg. 29 – 31. outubro. 2012.

SUMITA, Nairo M. Aspectos Técnicos, Metodológicos e Interpretação dos Exames Para Diagnóstico e Acompanhamento do Diabetes mellitus. 2014. Disponível em: <https://controllab.com/pdf/cl_pr_quest_bq_201407.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2017.

TAVARES-DIAS; M. *et al.* Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetro TAVARES-DIAS os sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (*Osteichthyes, Characidae*) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa 16 (2): 423 – 431, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E. F. S.. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Acta Scientiarum: biological science**, 20(2): 151-155. Jaboticabal-São Paulo, Brazil. 1998.

VEIVERBERG, C. A. *et al.* Alimentação de juvenis de carpa capim com dietas à base de farelos vegetais e forragem. **Acta Scientiarum Magazine**. Animal Sciences. Maringá, v. 32, n. 3, p. 247-253, 2010.

WEINERT, N. C. *et al.* Hematologia de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a protocolos anestésicos e de anticoagulação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 6, suplemento 2, p. 4237-4250. Lages, Santa Catarina, Brasil. 2015

YILDIZ, Y. H.; UZBILEK, K. M. The evaluation of secondary stress response of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Val. 1844) after exposing to the saline water. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdã **25**: 287–290.. 2001.

YOSHIOKA, E. T. *et al.* Avaliação do anticoagulante EDTA sobre as variáveis hematológicas do híbrido tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*). **Embrapa Amapá**. Universidade do Estado do Amapá. Macapá, AMAPÁ, BRASIL. 2012.

ZHENG, Q. *et al.* Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, hematology, antioxidant enzymes activity and expression for juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. **Fish Physiology Biochemistry**, Amsterdã 38:1059–1069 DOI 10.1007/s10695-011-9590-0.. 2012.