INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS NATURAIS

Efeito dos imunoestimulantes levamisol e glicano nas respostas fisiológicas e no desempenho de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, (Cuvier, 1817) sob condições de cultivo e transporte

ANA MARIA DIAS DA SILVA

Manaus, Amazonas
Setembro, 2011

ANA MARIA DIAS DA SILVA

Efeito dos imunoestimulantes levamisol e glicano nas respostas fisiológicas e no desempenho de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, (Cuvier, 1817) sob condições de cultivo e transporte

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Gusmão Affonso

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais – PPG/BTRN/INPA como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus, Amazonas
Setembro, 2011

S586 Silva, Ana Maria Dias da
Efeito dos imunoestimulantes levamisol e glicano nas respostas fisiológicas e no desempenho de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, (Cuvier, 1817) sob condições de cultivo e de transporte / Ana Maria Dias da Silva. --- Manaus : [s.n.], 2011.
138 f. : il. color.

Tese (dotourado) -- INPA, Manaus, 2011
Orientador : Elizabeth Gusmão Affonso
Área de concentração : Biologia de Água Doce e Pesca Interior

1. *Colossoma macropomum.* 2. Imunoestimulantes. 3. Tanques (aquacultura). 4. Transporte. 5. Estresse fisiológico. I. Título.

CDD 19. ed. 597.5041

SINOPSE:

Estudou-se o efeito dos imunoestimulantes levamisol e glicano suplementados a dieta de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, (Cuvier, 1817) sob condições experimentais, de cultivo e como minimizador das respostas de estresse causadas pelo transporte. Parâmetros fisiológicos e zootécnicos foram analisados.

Palavras-Chave: *Colossoma macropomum*, Imunoestimulantes, Tanques (aquacultura), Transporte, Estresse fisiológico.

Ao meu esposo Ricardo Camargo Silva de Lucena;
Ao meu pai Antônio, à minha mãe Antônia
e a minha tia Noemita (in memoriam).
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À *Deus, por tornar realidade todos os fatos e momentos que achamos impossíveis que ocorram em nossas vidas.*

À Dra. Elizabeth Gusmão Affonso pela orientação, ensinamentos, paciência, confiança e amizade que foram fundamentais para elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Roubach pela orientação, no começo de mais esta etapa de minha formação.

Ao meu esposo Ricardo pela paciência, compreensão e amor que foram fundamentais para conclusão dessa etapa de minha vida.

Aos meus pais Antônio, Antônia, aos meus irmãos Mariana, Maria Ivone, Maria José, José Maria, Raimundo e Mário Jorge, e a todos os outros da família por terem guiado e facilitado minha formação pessoal e profissional.

À minha eterna criação Miguel, que fez a minha vida mais alegre e feliz, e a todos os meus sobrinhos.

À Juciara pela paciência e ajuda nos trabalhos.

À minha tia Noemita (in memoriam), espero que esteja vendo aí de cima que não esqueci seus ensinamentos.

Ao Dr. Adalberto Luís Val por ter possibilitado algumas análises.

Às amigas Maeda, Janaina e Rafaela, que nossa amizade ultrapasse a distância e o tempo.

Ao amigo Rafael Duarte "Rafa" que me ajudou a fazer as análises de cortisol e lisozimas.

À Dra. Marise Sakuragui que me ajudou a fazer as análises de cortisol.

Às Amigas Janessa Sampaio de Abreu e Edsandra Campos Chagas pela ajuda nas análises de lisozima.

Aos funcionários da Embrapa Dr. Luís Inoue e Dra. Sheyla pelo apoio.

Ao Zezinho e a todos da secretaria do CPBA pelo apoio durante o curso.

Aos pescadores do CPAQ pelo apoio durante este trabalho.

Ao Técnico Evandro pela ajuda na elaboração das rações.

À Carminha, pela amizade e tudo que se refere ao BADPI.

A Dra. Ângela Varella pela contribuição e amizade.

À todos meus colegas do laboratório de Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura, por todo companheirismo, ajuda prestativa e auxílio imprescindível na análise do material, que fizeram desse período uma ótima lembrança de convívio Elenice, Kamilla, Mariana, Érica, Patrícia, Sarah, Rondon, Gisele, Juciara, Yara, Daniel, Marieta, Cássia, Guto, Polliana, Christian, Marcio e Gláuber.

Aos amigos da CPAQ: Inês, Fatinha, Suzana, Ana e Atílio.

À Jaqueline pela ajuda nos trabalhos com bactérias.

Ao Antônio Carlos pela ajuda no laboratório de microbiologia.

Ao Edvaldo pela ajuda nas análises dos íons plasmáticos.

Aos professores do BADPI, pela construção e reconstrução de conhecimentos e experiências vivenciadas neste período, que foram determinantes para minha formação pessoal e profissional.

À Capes e Fapeam pela concessão da bolsa.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

À SEPA/SEPROR/AM pela compra de reagentes.

À Biorigin pela doação do glicano e a Vetbrands pela doação do cloridrato de levamisol.

À todas as pessoas, que sempre me motivaram, e que da alguma forma ajudaram nesse trabalho.

Agradeço também, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para elaboração deste trabalho.

RESUMO

No presente trabalho, foram realizados três estudos com o objetivo de avaliar a eficiência dos imunoestimulantes levamisol e glicano suplementados à dieta para a melhoria do desempenho zootécnico e como mitigador do estresse em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*. No primeiro estudo (Capítulo 2), foi determinada a tolerância do tambaqui, à bactéria *Aeromonas hydrophila*, para determinar a 96h-DL_{50} (dose letal para 50% da espécie) para aplicação em testes de desafios. Os resultados demonstraram que juvenis de tambaqui apresentam elevada resistência à infecção causada por essa bactéria, cujo valor da 96h-DL_{50} calculada foi 2,4 x 10^{11} UFC de *A. hydrophila* mL^{-1} de solução salina. No Capítulo 3, foram avaliados os efeitos da suplementação de diferentes concentrações de levamisol e glicano no desempenho e nas respostas fisiológicas, bioquímicas e imunológicas dos juvenis de tambaqui em condições experimentais, após desafio com 60% da 96h-DL_{50} de *A. hydrophila*. Os resultados demonstraram que a suplementação de levamisol e glicano não influenciou o desempenho produtivo e o consumo de ração; não alterou as concentrações e a atividade de lisozima, porém, estimulou parte do sistema imune não-específico dos juvenis de tambaqui, entretanto, incapaz de minimizar as alterações fisiológicas provocadas pela infecção bacteriana. No Capítulo 4, foram avaliadas a eficácia de 250 mg de levamisol kg^{-1} e 5 mg de glicano kg^{-1} na dieta de tambaquis criados por 60 dias em sistema de tanques-rede e submetidos ao estresse do transporte e 24, 48 e 96 h de recuperação. Os resultados indicaram que as concentrações utilizadas não melhoraram o desempenho zootécnico dos peixes em tanques-rede e não foram eficázes na mitigação dos efeitos adversos do estresse de transporte em juvenis de tambaqui. Entretanto, a espécie demonstra capacidade adaptativa para retornar a homeostase após o período de 24 horas de recuperação pós-transporte.

Palavras-chave: *Colossoma macropomum*, estresse, imunoestimulantes, tanque-rede, transporte.

ABSTRACT

Three studies were held to evaluate levamisol and glucan in diet to improve juvenile tambaqui growth and stress mitigate effect. In the first experiment (Chapter 2), it was determined juvenile tambaqui tolerance to *Aeromonas hydrophila* (96h-LD_{50}) that ranged in 2,4 x 10^{11} UFC *A. hydrophila* mL^{-1} of saline solution. In the third chapter of this thesis, it was evaluated levamisole and glucan in diet effect on growth and juvenile tambaqui physiological, metabolic and immunological responses to 60% of 96h-LD_{50} *A. hydrophila.* The results allowed establishing levamisole and glucan in diet did not interfere on growth and feed conversion rates. Glucan and levamisole did not alter lisozyme activity but they stimulated part of non-specific immune system of juvenile tambaqui. However, they were unable to minimize to artificial bacteria infection. The best results were obtained with levamisole in concentration of 250 and glucan 5mg. In chapter 4, it was evaluated these two (250 and 5 mg) levamisole and glucan concentrations in diets given to juvenile tambaqui stocked in cages during 60 days. It was also evaluated growth and physiological stress responses of fish after transport. The results showed levamisole and glucan were not able to interfere on growth parameters. It was observed alterations on blood, biochemical and immunological parameters immediately after transport and fish recovery after 24 h. Levamisole and glucan could not minimize stress responses.

Keywords: *Colossoma macropomum*, stress, immunostimulant, cage, transport

SUMÁRIO

REVISÃO DE LITERATURA 1
1. Aquicultura atual 1
2. Aquicultura na Amazônia Brasileira 2
3. A espécie *Colossoma macropomum* 4
4. Fontes de estresse na piscicultura 5
5. Produção super intensiva de peixes em tanques-rede 8
6. Transporte 9
7. Imunoestimulantes 10
7.1. Levamisol 12
7.2. Glicanos 13
8. Referências Bibliográficas 16

OBJETIVOS 26
Objetivos Específicos 26

CAPITULO 1 - **Tolerância do tambaqui (*Colossoma macropomum*) a bactéria gram-negativa *Aeromonas hydrophila*** 27
Resumo 28
Abstract 29
1. Introdução 30
2. Material e Métodos 31
3. Resultados 34
4. Discussão 35
Agradecimentos 39
Referências Bibliográficas 39

CAPITULO 2 - **Respostas fisiológicas de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com levamisol e glicano, após desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*** 45
Resumo 47
Abstract 47
1. Introdução 48
2. Material e Métodos 51
3. Resultados 56
4. Discussão 58

Agradecimentos 65
Referências Bibliográficas 65

CAPITULO 3 - **Efeito da suplementação de levamisol e glicano nas respostas sanguíneas de tambaqui, *Colossoma macropomum*, durante o estresse de transporte** 83
Resumo 85
Abstract 85
1. Introdução 86
2. Material e Métodos 88
3. Resultados 92
4. Discussão 95
Agradecimentos 107
Referências Bibliográficas 108

CONSIDERAÇÕES FINAIS 124

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - **Tolerância do tambaqui (*Colossoma macropomum*) a bactéria gram-negativa *Aeromonas hydrophila***

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas da água durante 96 horas de experimento para determinação da DL_{50} de *Aeromonas hydrophila* em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum.* Controle = solução salina 0,85%; TR1 = $2{,}736x10^{10}$ UFC.mL^{-1}; TR2 = $2{,}736x10^{11}$ UFC.mL^{-1}; TR3 = $2{,}736x10^{12}$ UFC.mL^{-1}. Valores expressos em média ± desvio padrão. 43

Tabela 2. Mortalidade de tambaqui, *Colossoma macropomum*, após 96 h de inoculação peritoneal de diferentes concentrações de *Aeromonas hydrophila*. Controle = solução salina 0,85%; TR1 = $2{,}736\ x10^{10}$ UFC.mL^{-1}; TR2 = $2{,}736x10^{11}$ UFC.mL^{-1}; TR3 = $2{,}736\ x10^{12}$ UFC.mL^{-1}. 43

CAPÍTULO 2 - **Respostas fisiológicas de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com levamisol e glicano, após desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila***

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas da água dos tanques utilizados na criação de juvenis de tambaqui (*Colossomam macropomum*) alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de levamisol (L100, L250, L500 com 100, 250 e 500 mg de levamisol.kg^{-1} ração) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg de glicano.kg^{-1} de ração), por um período de 60 dias. Valores são média ± desvio padrão. 74

Tabela 2. Variáveis físicas e químicas da água dos tanques utilizados na criação de juvenis de tambaqui (*Colossomam macropomum*) alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de levamisol (L100, L250, L500 com 100, 250 e 500 mg de levamisol.kg^{-1} ração) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg de glicano.kg^{-1} de ração), após 7 dias de infecção bacteriana. Valores são média ± desvio padrão. 75

Tabela 3. Variáveis físicas e químicas da água dos tanques utilizados na criação de juvenis de tambaqui (*Colossomam macropomum*) alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de levamisol (L100, L250, L500 com 100, 250 e 500 mg de levamisol.kg^{-1} ração) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg de glicano.kg^{-1} de ração), após 15 dias de infecção bacteriana. Valores são média ± desvio padrão. 76

Tabela 4. Consumo diário de ração (CDR), ganho de peso (GP), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), fator de condição (FC), coeficiente de variação do crescimento (CV), taxa de sobrevivencia (TS) e produção por área (P/A) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, suplementados com diferentes níveis de inclusão de levamisol (L100, L250, L500 com 100, 250 e 500 mg de levamisol.kg^{-1} ração) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg de glicano.kg^{-1} de ração) por um período de 60 dias. Valores são média ± desvio padrão. 77

CAPÍTULO 3 - **Efeito da suplementação de levamisol e glicano nas respostas sanguíneas de tambaqui, *Colossoma macropomum*, durante o estresse de transporte**

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas da água do viveiro com criação de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, em tanques-rede, durante 60 dias alimentados com dietas suplementadas com 5 mg de glicano.kg^{-1} e 250 mg de levamisol.kg^{-1} de ração. 118

Tabela 2. Variáveis físicas e químicas da água das sacolas após 6 horas de transporte de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados por 60 dias com dietas suplementadas com imunoestimulantes. TR1 = ração comercial (sem suplementação); TR2 = ração suplementada com 5 mg de glicano.kg^{-1} de ração; TR3 = ração suplementada com 250 mg de levamisol.kg^{-1} de ração. Média ± desvio padrão. 118

Tabela 3. Variáveis físicas e químicas da água dos tanques de recuperação, durante 96 h, dos juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com imunoestimulantes e submetidos ao estresse de transporte. TR1 = ração comercial (sem suplementação); TR2 = ração suplementada com 5 mg de glicano.kg^{-1} de ração; TR3 = ração suplementada com 250 mg de levamisol.kg^{-1} de ração. 119

Tabela 4. Consumo diário de ração (CDR), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), fator de condição (FC), coeficiente de variação do crescimento (CV), taxa de sobrevivência (TS) e produção por área (P/A) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com imunoestimulantes, durante 60 dias, em sistema de tanque-rede. TR1 = ração comercial (sem suplementação); TR2 = ração suplementada com 5 mg de glicano.kg^{-1} de ração; TR3 = ração suplementada com 250 mg de levamisol.kg^{-1} de ração. 119

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Exemplar de tambaqui, *Colossoma macropomum* 5

CAPÍTULO 1 - **Tolerância do tambaqui (*Colossoma macropomum*) a bactéria gram-negativa *Aeromonas hydrophila***

Figura 1. Sinais clínicos observados no tambaqui, *Colossoma macropomum*, infectado com a bactéria Aeromonas hydrophila: perdas de escamas e exoftalmia (A), hemorragia (B), erosão nas nadadeiras (C) e lesões na pele (D). 44

CAPÍTULO 2 - **Respostas fisiológicas de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com levamisol e glicano, após desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila***

Figura 1. Hematócrito (A), concentração de hemoglobina (B), número de eritrócitos (C), volume corpuscular médio - VCM (D), concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM (E) e hemoglobina corpuscular média - HCM (F) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com 100, 250 e 500 mg levamisol.kg^{-1} (L100, L250 e L500) e 1, 5 e 10 mg glicano.kg^{-1} (G1, G5 e G10) e o controle (sem adição de imunoestimulantes), por 60 dias (pré-desafio) e após 7 e 15 dias de infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Média ± DP. 78

Figura 2. Número de leucócitos (A) e trombócitos (B) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de inclusão de levamisol (L100, L250 e L500 com 100, 250 e 500 mg.kg^{-1}) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg.kg^{-1}) e o controle (sem adição de imunoestimulantes), por 60 dias (pré-desafio) e após 7 e 15 dias de infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Média ± DP. Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p<0,05$). 79

Figura 3. Concentração de cortisol plasmático (A) e glicose plasmática (B) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de inclusão de levamisol (L100, L250 e L500 com 100, 250 e 500 mg.kg^{-1}) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg.kg^{-1}) e o controle (sem adição de imunoestimulantes), por 60 dias (pré-desafio) e após 7 e 15 dias de infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Média ± DP. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os períodos em cada tratamento. 80

Figura 4. Concentração dos íons plamáticos sódio (A), cloretos (B), cálcio (C) e potássio (D) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de inclusão de levamisol (L100, L250 e L500 com 100, 250 e 500 mg. kg^{-1}) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg. kg^{-1}) e o controle (sem adição de imunoestimulantes), por 60 dias (pré-desafio) e após 7 e 15 dias de infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Média ± DP. 81

Figura 5. Concentração (A) e atividade de lisozima (B) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de inclusão de levamisol (L100, L250 e L500 com 100, 250 e 500 mg.kg^{-1}) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg.kg^{-1}) e o controle (sem adição de imunoestimulantes), por 60 dias (pré-desafio) e após 7 e 15 dias de infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Média ± DP. 82

CAPÍTULO 3 - **Efeito da suplementação de levamisol e glicano nas respostas sanguíneas de tambaqui, *Colossoma macropomum*, durante o estresse de transporte**

Figura 1. Ganho de peso (GP) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, criados em sistema de tanques-rede e alimentados por 60 dias com e sem suplementação de levamisol e glicano na dieta. TR0 = início dos experimentos; TR1 = controle (sem suplementação); TR2 = ração + 5 mg glicano.kg^{-1}; TR3 = ração + 250 mg levamisol.kg^{1}. Média ± desvio padrão. 120

Figura 2. Hematócrito (A), hemoglobina (B), número de eritrócitos (C), volume corpuscular médio - VCM (D), hemoglobina corpuscular média - HCM (E) e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM (F) de *Colossoma macropomum* criada em sistema de tanques-rede e alimentada por 60 dias com e sem suplementação de levamisol e glicano na dieta (AT) e submetidos por 6 h ao transporte (PT) e a recuperação por 24, 48 e 96 h. Média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas no mesmo tratamento entre as diferentes etapas do transporte (N = 18 peixes). 121

Figura 3. Leucócitos (A), trombócitos (B), cortisol (C) e glicose (D) de *Colossoma macropomum* criado em sistema de tanques-rede e alimentado por 60 dias com e sem suplementação de glicano e levamisol na dieta (AT) e submetidos por 6 h ao transporte (PT) e a recuperação por 24, 48 e 96 h. Média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas no mesmo tratamento entre as diferentes etapas do transporte (N = 18 peixes). 122

Figura 4. Concentração plasmática de sódio (A), potássio (B), cálcio (C) e cloretos (D) de *Colossoma macropomum* criado em sistema de tanques-rede e alimentado por 60 dias com e sem suplementação de glicano e levamisol na dieta (AT) e submetidos por 6 h ao transporte (PT) e a recuperação por 24, 48 e 96 h. Média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas no mesmo tratamento entre as diferentes etapas do transporte (N = 18 peixes). 123

Figura 5. Concentração (A) e atividade de lisozima (B) de *Colossoma macropomum* criado em sistema de tanques-rede e alimentado por 60 dias com e sem suplementação de glicano e levamisol na dieta (AT) e submetidos por 6 h ao transporte (PT) e a recuperação por 24, 48 e 96 h. Média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas no mesmo tratamento entre as diferentes etapas do transporte (N = 18 peixes). 124

REVISÃO DE LITERATURA

Efeito dos imunoestimulantes levamisol e glicano nas respostas fisiológicas e no desempenho de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1817), sob condições de cultivo e transporte

1. Aquicultura atual

Atualmente, a aquicultura é responsável pela metade da produção de pescado consumido pela população mundial, devido à crescente demanda por proteína de origem animal, associada à redução dos estoques pesqueiros, o que a torna uma alternativa viável para a produção de alimentos (Food and Agriculture Organization - FAO, 2010). Além disso, essa atividade tem sido estratégica no desenvolvimento econômico e social, gerando emprego e renda em outros segmentos do Agronegócio, como as indústrias de rações, medicamentos e equipamentos (FAO, 2010). Contudo, durante a sua prática deve-se levar em consideração a sustentabilidade ambiental, social e econômica (FAO, 2010).

No ano de 2008, esta atividade agropecuária gerou cerca de 52,5 milhões de toneladas de pescado para o consumo humano, avaliados em US$ 98,4 bilhões; com a perspectiva de alcançar 82 milhões de toneladas de pescado no ano de 2050 (FAO, 2010). A aquicultura é o setor de produção animal que mais cresce no mundo, sendo os países asíaticos os maiores produtores. Nesse cenário, o Chile ocupa a 8ª colocação na produção de pescado mundial e o Brasil a 21ª (Minitério da Pesca e Aquicultura – MPA, 2010), cujo crescimento tem sido superior a 40% nos últimos anos, índice maior que a média mundial, que varia de 12 a 21% (FAO, 2010; MPA, 2010).

O Brasil é considerado um país com grande potencial para a produção aquícola, por apresentar condições favoráveis ao cultivo de inúmeras espécies de peixes nas diferentes regiões, ser auto-suficiente na produção de grãos e ingredientes utilizados nas rações, ter grandes disponibilidades de áreas e recursos hídricos além de condições climáticas que favorecem a piscicultura de água doce, com destaque à bacia Amazônica (Ono, 2005). Devido estas características, observa-se uma intensificação dos sistemas de produção de peixes no país (MPA, 2010).

No ano de 2009 a produção aquícola brasileira foi de 415.649 toneladas, evidenciando um crescimento aproximado de 43% nos últimos três anos. A piscicultura foi a modalidade da aquicultura que mais cresceu neste período, passando de 210.640 toneladas em 2007 para 365.367 toneladas em 2009, representando cerca de 60% da produção nacional (MPA, 2010). Segundo estimativas do Minitério da Pesca e Aquicultura, até o final de 2011, a aquicultura deve produzir cerca de 570.000 toneladas de pescado, e isto deve-se aos investimentos estratégicos no setor de aquicultura pelo Governo Federal e várias secretarias estaduais. Toda essa estrutura governamental foi criada com o objetivo de desenvolver estratégias que estimulem o crescimento da aquicultura, por meio de instalações de unidades demonstrativas, construções de unidades de larvicultura, criação de linha de crédito de financiamento especial para a atividade, programas nacionais de suporte às cooperativas de aquicultores e serviços de extensão, pesquisa e mercado (FAO, 2010).

Dentre as espécies de peixe mais cultivadas no Brasil, estão a tilápia (*Oreonchus niloticus*) com 132.957 toneladas, a carpa (*Cyprinus carpio*) com 80.895 toneladas e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) com 46.454 toneladas. A produção de tambaqui no país tem apresentado crescimento contínuo desde 2003 e, atualmente, representa 14% do total da produção de pescado da piscicultura brasileira, e com um crescimento de 66% em 2009 em relação a 2007 (MPA, 2010).

A região Norte, embora com um menor crecimento de produção aquícola, comparada ao restante do Brasil, teve um incremento significativo em 2009, com cerca de 35.782 toneladas (MPA, 2010). No estado do Amazonas, o crescimento da produção de peixes ultrapassou 10% de 2008 a 2009, alcançando 10.234 toneladas, sendo o 10º estado brasilero na produção aquícola continental. Entretanto, esta produção ainda é insuficiente para atender o mercado de Manaus (Secretaria Executiva da Pesca e Aquicultura do Estado do Amazonas SEPA/SEPROR, 2010). Ao contrário, a pesca extrativa, que produziu 71.109 toneladas no mesmo período, tem se mantido praticamente estabilizada nos últimos anos, assim como nas demais regiões do país.

2. Aquicultura na Amazônia Brasileira

A Amazônia tem sido vista como uma das regiões mais promissoras para o avanço da piscicultura no Brasil e isto se deve à grande extensão de seus recursos hídricos, ao clima favorável e à ampla variedade de espécies de peixes de alto valor comercial (Ono, 2005). No ano de 2009, a região Norte foi responsável por 21,5% de pescados oriundos da aquicultura

(MPA, 2010). Esta atividade vem apresentando resultados positivos, porém discretos, se compararmos às dimensões da região.

Dentre os obstáculos para o desenvolvimento da aquicultura na região, podem ser citados: a relativa abundância dos estoques pesqueiros naturais; o isolamento geográfico que dificulta o acesso aos principais mercados consumidores; a carência de informações sobre a biologia e a cadeia produtiva das principais espécies; a deficiência de infraestrutura básica para criação de peixes; baixo nível tecnológico da maioria das pisciculturas instaladas na região; deficiência ou ausência de serviços de assistência técnica; distância dos grandes centros cerealistas, o que eleva o custo da ração e, consequentemente, da produção (Ono, 2005; Gandra, 2010).

Apesar destes obstáculos, diferentes setores da sociedade (governo municipal, estadual e federal, instituições de pesquisa e ensino, agências financiadoras, empreendedores, dentre outras) têm concentrado esforços para mudar este quadro, pois vêem na aquicultura grandes possibilidades para torná-la uma atividade de desenvolvimento sustentável na região (Ono, 2005; Santos, 2009). Exemplo disto são os inúmeros projetos de pesquisa que têm como objetivo fornecer tecnologia para o cultivo das espécies nativas de maior interesse da piscicultura na região, como o tambaqui (*C. macropomum*) e o matrinxã (*Brycon amazonicus*), que são as duas principais espécies cultivadas na região e, mais recentemente, o pirarucu (*Arapaima gigas*) que apresenta um grande potencial para a produção de pescado (Ono, 2005; Gandra, 2010).

Dentre os diversos sistemas de produção de peixes, as barragens e os viveiros escavados são os mais utilizados na piscicultura da região (Melo *et al*., 2001; Ono, 2005; Gandra, 2010). Contudo, as restrições ambientais para a implantação desses sistemas de criação têm estimulado o emprego de outros sistemas intensivos de produção, tais como os cercados em canais de igarapés de terra firme e tanques-rede. O sistema de criação em canais de igarapés tem demonstrado grandes perspectivas como uma atividade economicamente sustentável e sem dano ao meio ambiente para as comunidades carentes da região (Waltricke, 2007). Já o sistema de criação em tanques-rede, utilizado no presente estudo, vem crescendo no Brasil e na região amazônica, principalmente por apresentar menor custo de investimento, tecnologia disponível e permite o aproveitamento dos corpos d'água naturais e ou represados no país (Ono e Kubtiza, 2003; Ono, 2005; Gomes *et al*., 2004; Kubitza, 2010; Chagas, 2010). O tambaqui é uma espécie de peixe que se desenvolve bem em tanques-rede de pequeno volume na fase de recria (Brandão *et al*., 2004) e sua criação pode ser realizada em tanques-

rede com volumes de 1 a 6 m^3, sem prejuízo zootécnico para o piscicultor (Gomes *et al.*, 2004; Chagas, 2010).

3. A espécie *Colossoma macropomum*

O tambaqui, caracídeo endêmico das bacias do Amazonas e Orinoco, é o segundo maior peixe de escamas da América do Sul, chegando a medir até 1 m de comprimento e pesar 30 kg. Essa espécie tem preferência por águas ricas em nutrientes e é capaz de resistir a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (~1mg/L), principalmente devido à respiração na superfície aquática (RSA), onde ocorre a expansão do lábio inferior, que funciona como um funil, deixando passar a fina camada superficial de água, rica em oxigênio, em direção as brânquias (Val e Almeida-Val, 1995). Possui hábito alimentar diversificado com tendência à onivoria, o que favorece a utilização de uma ração com uma menor concentração protéica durante o cultivo. Economicamente, o tambaqui é a espécie mais importante na pesca e piscicultura da região amazônica (Santos, 2009).

Por ser muito apreciado pela população local e nacional, o tambaqui tem mercado consumidor garantido. Na região metropolitana de Manaus, por exemplo, a produção de tambaqui curumim (0,350 a 0,450 kg), destinada as refeições dos funcionários do Distrito Industrial de Manaus, foi estimada em 3.000 toneladas no ano de 2009. Nas feiras e mercados, o tambaqui curumim, o tambaqui roelo (0,800 e 1,5 kg) e o tambaqui jovem (2,0 a 3,0 kg) são comercializados por R$ 3,50; R$ 5,00 e R$ 10,00/kg respectivamente. Atualmente, 80% do tambaqui ofertado no Amazonas é originário da piscicultura regional (Gandra, 2010; SEPA/SEPROR, 2010), entretanto, o volume de produção poderá ser expandido com investimentos em pesquisas que venham contribuir com a melhoria de sua cadeia produtiva, assim como o ordenamento e a organização do setor produtivo no estado.

O sucesso na criação desta espécie deve-se as suas excelentes características para o cultivo, pois, adapta-se facilmente ao cativeiro e aceita bem rações, grãos e sub-produtos agro-industriais (Roubach *et al.*, 2003; Santos, 2009). Além disso, possui boa conversão alimentar, em média 1,8 (Gomes *et al.*, 2006), facilidade de manejo para reprodução induzida, o que garante a disponibilidade de juvenis o ano todo, rápido crescimento, fácil manejo (Castagnolli, 1992; Chagas, 2010), alta resistência à doenças (Pavanelli, 2010) e tolerância à grandes variações de temperaturas, de 26 ºC a 35 ºC (Saint-Paul, 1986). O tambaqui, no ano de 2009, representou 82% da produção aquícola no estado do Amazonas, com aproximadamente 8.000 toneladas, número insuficiente para suprir a demanda local, que foi abastecida com aproximadamente 6.000 toneladas de peixes provenientes dos estados de

Roraima, Rondônia e Acre (Gandra, 2010). Além disso, na Amazônia Central, os estoques naturais de tambaqui encontram-se sobre-explorados (Isaac e Rufino, 1996; Silva *et al*., 2007), sendo protegidos pelo IBAMA (Art. 1º - Instrução Normativa nº 35 de 29/09/2005), com período de defeso de outubro a março. Dessa forma, a criação de tambaqui é uma atividade estratégica na região, pois, além das vantagens de cultivo inerentes à espécie, este é um produto de exelente aceitação no mercado.

Figura 1. Exemplar de tambaqui, *Colossoma macropomum*.

4. Fontes de estresse na piscicultura

Em sistema de criação intensivo, os peixes são frequentemente expostos a procedimentos estressores, pois, em todas as fases do processo de produção, é comum a ocorrência de práticas geradoras de estresse, tais como: transporte, captura, confinamento, variação na qualidade da água, entre outros (Werdermayer, 1996; Wendelaar Bonga, 1997; Urbinati *et al.*, 2004;). Estes fatores propiciam um aumento da incidência de doenças, prejudicam o desempenho dos peixes e podem levar até a morte.

O estresse pode ser definido como um conjunto de respostas fisiológicas generalizadas de um organismo na presença de agentes estressores internos ou externos. Esses agentes podem ser físicos, químicos ou sociais. Convencionalmente, as respostas ao estresse são classificadas em primárias, secundárias e terciárias, de acordo com a natureza, a duração e o tipo do agente estressor. Estas respostas evoluíram a partir de mecanismos adaptativos que permitem ao animal manter a homeostase, frente a estímulos adversos, permitindo a utilização de reservas energéticas indisponíveis em condições normais (Pickering, 1981; Bendhach *et al.*, 2009).

As respostas primárias (neural e neuro-endócrinas) representam à percepção de uma alteração e o início das respostas neuro-endócrinas, incluindo a rápida liberação de catecolaminas e cortisol para a circulação sistêmica (Barton e Iwana, 1991; Mazeaud *et al*., 1997). As respostas secundárias, resultantes das respostas primárias, incluem ajustes bioquímicos e fisiológicos e são mediadas, até certo ponto, pelos hormônios do estresse. Entre estas respostas estão os efeitos metabólicos, como alterações na glicemia, no conteúdo de ácido láctico, glicogênio hepático e muscular; efeitos sanguíneos, como alterações no número de células vermelhas e brancas e, ainda os efeitos hidro-eletrolíticos, como alterações nas concentrações plasmáticas de íons cloro, sódio, potássio e cálcio e na osmolaridade (Eddy, 1981; Wedelaar Bonga, 1997; Wojtaszek *et al*., 2002; Abreu, 2007). As respostas terciárias são caracterizadas pelas alterações comportamentais, diminuição do crescimento, da capacidade reprodutiva e aumento da suscetibilidade às doenças, representando alterações associadas ao estresse de indivíduos ou populações (Wendemeyer, 1996; Mazeaud *et al*., 1997). Assim como em outros vertebrados, os peixes estressados apresentam respostas generalizadas, caracterizadas por aumento dos hormônios de estresse e mudanças fisiológicas (Baldisseroto, 2002).

Os ajustes do organismo às diferentes situações do ambiente podem ser muitas vezes, responsáveis pela sobrevivência e, posteriormente, pela perpetuação da espécie em determinado ecossistema, ao longo de sua história evolutiva. Nesse sentido, o acompanhamento de alterações nos padrões fisiológicos e comportamentais é fundamental para o esclarecimento dos aspectos biológicos dos peixes (Wedelaar Bonga, 1997; Carneiro e Urbinati, 2001; Inoue *et al.*, 2010).

O cortisol, principal hormônio glicocorticóide em peixes, é considerado um bom indicador para avaliação das respostas primárias ao estresse (Barton e Iwama, 1991; Gomes *et al.*, 2006; Inoue *et al*., 2010). Vários trabalhos relatam o aumento nas concentrações de cortisol na corrente sanguínea de peixes submetidos a vários tipos de estressores, como transporte (Sadler *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2003; Brandão *et al*., 2006; Oliveira, 2008; Inoue *et al*, 2010; Chagas, 2010; Nunes, 2010), confinamento (Monteiro *et al*., 1999) e captura (Pottinger, 1998; Abreu *et al*., 2009). O aumento nos níveis de cortisol circulante em resposta aos estressores é considerado uma resposta adaptativa importante para manter os ajustes da homeostase em relação ao estresse (Wendelaar Bonga, 1997; Momnsen *et al*., 1999). Esse hormônio estimula a glicogenólise no fígado, ocasionando uma hiperglicemia, além de estimular também a gliconeogênese neste mesmo órgão (Pieckering, 1981; Wenderlaar Bonga, 1997). Os resultados de cortisol podem ser facilmente comparados com outras espécies, haja

vista que existem inúmeras pesquisas sobre este hormônio (Schorer, 2008). Dentre os estudos realizados com espécies de peixes nativas da região amazônica e de interesse para a piscicultura brasileira, foi registrado aumento nos níveis de cortisol e glicose durante o estresse de transporte no matrinxã (Carneiro e Urbinati, 2001; Urbinati *et al*., 2004; Oliveria, 2008), no tambaqui (Gomes *et al*., 2003) e no pirarucu (Brandão *et al*., 2006; Gomes *et al*., 2006).

A glicemia, por ser uma resposta ao aumento nas concentrações de cortisol e catecolaminas, é considerada um bom indicador para quantificar o estresse em peixes, além da simplicidade dos métodos e o baixo custo, quando comparado a análise de cortisol. A liberação desses hormônios estimula a gliconeogênese hepática, elevando os níveis de glicose sanguínea (Wenderlaar Bonga, 1997; Tavares-Dias e Moraes, 2004). Outros efeitos secundários, característicos do estresse, e provocados pelas respostas primárias, são a ocorrência de acúmulo de ácido lático nos músculos, alterações hematológicas, alterações nas concentrações plasmáticas de cloro, sódio, potássio, proteínas e osmolaridade, alterações nos níveis de glicogênio, lipídeos e proteínas, em outros tecidos (Morata *et al*., 1982; Hemre e Krogdahl, 1996; Carneiro e Urbinati, 2001; Tavares-Dias e Moraes, 2004; Schorer, 2008).

Variáveis hematológicas, como hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e número ou percentual de linfócitos, são consideradas indicadores hematológicos auxiliares da resposta de estresse e podem ser utilizadas na avaliação do estado de saúde dos peixes (Morgan e Iwama, 1997; Tavares-Dias e Moraes, 2004). O aumento nesses parâmetros sugere maior capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, na tentativa de suprir o aumento da demanda energética, sendo este um indicador importante do estresse (Menezes *et al*., 2006; Abreu, 2007; Affonso *et al.*, 2007; Andrade *et al*., 2007). O cortisol parece alterar, ainda, o número e a afinidade de receptores específicos nos leucócitos sanguíneos periféricos, como verificado na carpa comum (Weys *et al*., 1998). Em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, a captura e exposição aérea, por 30 segundos, provocaram aumento no percentual de linfócitos, reforçando a ocorrência de linfocitose como resposta ao estresse (Martins *et al.*, 2000). Resposta semelhante foi encontrada em matrinxã submetida ao transporte por 4 horas (Carneiro *et al.*, 2002) e 5 horas (Oliveira, 2008). As alterações decorrentes do estresse, em alguns casos, não são consistentes com o padrão esperado, tornando complexa a interpretação dos resultados. Por exemplo, Carneiro *et al.* (2002) e Abreu e Urbinati (2006) estudando matrinxã, não encontraram diferenças significativas no número total de leucócitos, mesmo após terem submetido os peixes à captura e exposição aérea por dois minutos. Essas diferenças são influenciadas por diversos fatores, tais como sexo, tamanho, estado nutricional do animal, entre outros, que podem interferir nas alterações quantitativas das variáveis sanguíneas

(Tavares-Dias *et al.*, 1999) e, por esta razão, as respostas hematológicas devem ser consideradas indicadores auxiliares no diagnóstico de estresse.

A utilização dos parâmetros hematológicos como indicadores de saúde em peixes foi proposta por Hesser (1960), no entanto, esta técnica tem sido modestamente utilizada em sistemas de produção. Ranzani-Paiva *et al*. (2004) ressaltaram que as avaliações sanguíneas relacionadas às respostas fisiológicas dos peixes têm sido frequentemente adotadas por pesquisadores. Assim, as análises hematológicas são utilizadas largamente na avaliação do estado de saúde dos peixes, sendo importante ferramenta para identificação de estresse que o ambiente e os parasitas podem causar aos peixes (Tavares-dias e Moraes, 2004; Tavares-Dias *et al*., 2009). Dessa forma, o estabelecimento de referências das variáveis hematológicas para as principais espécies cultivadas é muito importante no diagnóstico de doenças (Tavares-Dias *et al*., 2009; Tavares-Dias *et al*., 2010). Recentemente, foram determinados valores de referências para os parâmetros eritrocitários de espécies de cultivo, como o tambaqui, matrinxã, pirarucu, entre outros (Tavares-Dias *et al*., 2009; Tavares-Dias *et al*., 2010).

5. Produção super intensiva de peixes em tanques-rede

Sistemas super intensivos de produção são caracterizados pelo elevado adensamento populacional. Em tanques-rede, a produção de peixes pode variar de 20 a 300 kg/m^3, dependendo da espécie e do tipo de criação (Castagnolli, 2004; Ono, 2005). A produção em tanques-rede é o sistema no qual os peixes são confinados, sob altas taxas de estocagem, dentro de estruturas, geralmente flutuantes, que permitem a troca de água com o ambiente. Este tipo de sistema é bastante difundido no mundo, tanto na produção de peixes em pequena escala, quanto na produção industrial. Um exemplo é a utilização desse sistema pelos maiores produtores de salmão no Chile e na Noruega (FAO, 2010).

No Brasil a criação de peixes em tanques-rede vem crescendo de forma expressiva, devido, principalmente, ao aproveitamento de reservatórios e corpos de água naturais (Ono e Kubitza, 2003; Ono, 2005; Kubtiza, 2010). De acordo com Ono e Kubitza (2003), o desempenho dos peixes neste tipo de cultivo depende de alguns fatores, tais como: a qualidade da água, dos alevinos e da ração, as técnicas de manejo e a capacidade técnica e gerencial do produtor. A implantação do sistema de tanques-rede tem sido incentivada em toda região Norte do Brasil, pois é uma boa opção para o aproveitamento dos recursos hídricos existentes na região. Além disso, sua implantação pode evitar o desmatamento de novas áreas ou construção de grandes infraestruturas para criação, apresenta afinidade com métodos tradicionais utilizados pelas populações ribeirinhas e não depende de energia elétrica

para sua operação (Ono, 2005). Segundo esse autor, a principal restrição para o desenvolvimento deste sistema na região é a escolha de uma área apropriada, o que exige um prévio estudo criterioso das características ambientais.

Estudos realizados com matrinxã, pirarucu e tambaqui demonstraram resultados positivos para o cultivo destas espécies em tanques-rede (Cavero *et al*., 2003; Brandão *et al*., 2004; 2005**;** Menezes *et al*., 2006; Gomes *et al*., 2006; Chagas *et al*., 2007). A produção de tambaqui em tanques-rede vem aumentando consideravelmente no país, mas por ser uma atividade nova e ainda não ter um pacote tecnológico definido, poucos resultados foram obtidos para a espécie (Brandão *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2004; Chagas *et al*., 2007). Baldisseroto e Gomes (2005) registraram bons índices de produção e de sobrevivência dessa espécie, mostrando sua capacidade em se adaptar bem em sistemas super intensivos de criação. Embora a criação de tambaqui em tanques-rede ainda não seja um sistema utilizado pelos piscicultores no estado do Amazonas, devido, principalmente, aos custos com estruturas e com uma ração completa e balanceada, vários projetos vêm sendo realizados em comunidades rurais da região.

6. Transporte

Outra atividade que se caracteriza como agente estressor na piscicultura é a prática de transporte de animais vivos, sejam de juvenis ou adultos (Kubtiza, 1997; Inoue *et al.*, 2010). Essa é uma etapa traumática, por apresentar consequências agudas e desenvolver respostas ao estresse (Urbinati *et a.l*, 2004; Inoue *et al.*, 2010). Para minimizar tais efeitos, a utilização de alguns procedimentos e técnicas preparatórias relacionadas ao peixe, à água, aos equipamentos e ao manejo envolvido na operação é importante antes, durante e após o transporte dos peixes (Grottum *et al*., 1997; Kubtiza, 1997; Lim *et al*., 2003; Oliveira, 2008).

No pré-transporte, é recomendado que se adote o jejum ou restrição alimentar (Carneiro e Urbinati, 2001; Gomes *et al*., 2003). No transporte, é comum a adição de substâncias na água (anestésicos, cloreto de sódio, sulfato de cálcio, cloreto de cálcio, entre outros), a troca da água por outra de melhor qualidade e a redução das densidades de estocagem (Kubitza, 1997; Carneiro e Urbinati, 2002; Gomes e Urbinati, 2005; Gomes *et al*., 2006). No entanto, tais procedimentos, muitas vezes, não são suficientes para evitar a mortalidade dos peixes após o transporte (Oliveira, 2008; Nunes, 2010).

Os distúrbios osmorregulatórios são a maior causa da morte durante e após o transporte dos peixes (Mazeaund *et al.*, 1977; Eddy, 1981, Tsuzuki *et al*., 2001). Para minimizar as perdas de íons para o meio, é comum, durante o transporte, a adição de sal na

água que tem como objetivo diminuir o gradiente osmótico entre o plasma e o ambiente, ajudando a reduzir o gasto energético para a manutenção da homeostase osmorregulatória (Tsuzuki *et al*., 2001). Uma alternativa para diminuir as perdas no pós-transporte é o uso de imunoestimulantes na ração dos peixes semanas antes do transporte, pois isto pode ajudar a prevenir os efeitos negativos do estresse causado por esta atividade (Jeney *et al*., 1997; Gomes *et al*., 2006; Emata, 2000; Carneiro e Urbinati, 2001; Li *et al*., 2006; Palic *et al*., 2006).

7. Imunoestimulantes

Os imunoestimulantes formam um grupo que inclui substâncias biológicas e sintéticas, as quais intensificam os mecanismos de defesa não específicos, e, consequentemente, as respostas imune específicas, fornecendo resistência contra patógenos (Skjermo *et al.*, 2004; Li, *et al*., 2006: Abreu *et al*., 2009). Dessa forma, o uso de imunoestimulantes para prevenção de doenças em peixes é considerada uma área atrativa e promissora (Secombes, 1994; Siwicki *et al.*, 1994; Huttenhuis *et al.*, 2006; Abreu, *et al*, 2009; Chagas, 2010).

A capacidade de aumentar a aptidão fagocítica das células, a ativação de linfócitos e a resistência à doenças infecciosas tem sido demonstrada por meio da utilização de imunoestimulantes (Sakai, 1999). Segundo Bricnell e Dalmo (2005), os imunoestimulantes são compostos de ocorrência natural, que modulam o sistema imune através do aumento da resistência do hospedeiro à doenças que, geralmente, são causadas por agentes patogênicos. Dessa forma, grande atenção vem sendo dada a essas substâncias e a sua utilização na aquicultura (Cuesta *et al.,* 2002; Sado, 2008). O intenso manejo a que os peixes são submetidos em sistemas intensivos de produção (alimentação intensiva, manipulação/seleção, reprodução, despesca e transporte) rompe seu equilíbrio homeostático, principalmente no que se refere ao sistema imune (Barcellos *et al*., 2001), aumentando sua susceptibilidade a enfermidades fúngicas, bacterianas e parasitárias (Davis *et al*., 2002).

Os imunoestimulantes podem ser administrados através de injeção, imersão, administração intragástrica ou intestinal e como complementos na dieta, com o objetivo profilático ou como tratamento supressivo de agentes patogênicos latentes ou subletais (Sealey e Gatlin, 1999). Essas aplicações têm sido utilizadas em peixes adultos e juvenis comsistema imune imaturo enquanto que na larvicultura essas aplicações são menos comuns (Vadstein, 1997; Bricknell e Dalmo, 2005; Siwick *et al*, 2009).

Existem inúmeras substâncias que atuam como imunoestimulantes, entretanto, são poucas aquelas adequadas para uso na aquicultura (Sakai, 1999). Substâncias como levamisol,

glicanos, quitina, lactoferrina e outros fatores nutricionais, tais como, vitaminas B e C, hormônio de crescimento e prolactina foram as que se mostraram mais eficientes na estimulação do sistema imune em peixes (Sakai, 1999; Burrells *et al*., 2001; Abreu, 2007; Chagas, 2010).

Os imunoestimulantes podem ser utilizados como uma alternativa para o uso, de antibióticos e vacinas, métodos tradicionalmente utilizados na aquicultura para tratamento e prevenção de doenças. A sua aplicação evitaria o desenvolvimento de cepas de bactérias mais resistentes ao tratamento antibiótico, ou a ocorrência de resíduos de antibióticos em peixes destinados ao consumo humano (FAO, 2010; Siwicki *et al*., 2009). Já o seu efeito não específico garante resistência contra uma grande variedade de doenças, enquanto que a vacinação protege contra um patógeno específico (Anderson 1992; Sakai 1999; Huttenhuis *et al*., 2006).

Além de promover uma resposta imune mais efetiva a agentes infecciosos, os imunoestimulantes minimizam os efeitos do estresse (Anderson, 1992; Gatlin *et al*., 2006). A redução das respostas imunes em peixes e os mecanismos de imunossupressão induzidos por glicocorticóides são bem caracterizados (Mazeaud e Mazeaaud, 1981; Barton e Iwana, 1991) e, em função disto, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de minimizar o estresse na criação de peixes, dentre eles, a suplementação dietética com vitamina C, glicano e levamisol (Jeney *et al*., 1997; Verlhac *et al*., 1998; Carneiro e Urbinati, 2001; Menezes *et al*., 2006; Affonso *et al*., 2007; Andrade *et al*., 2007; Oliveira, 2008; Shorer, 2008; Abreu *et al*., 2009; Chagas, 2010). Segundo Gatlin *et al.* (2006), os imunonutrientes são substâncias necessárias em quantidades adequadas, como quaisquer outros nutrientes, para o funcionamento normal do sistema imune, sendo envolvido em diversas reações fisiológicas. Segundo a literatura, alguns nutrientes como as vitaminas C e E influenciam o sistema imune e possuem a mesma função biológica: atuam como antioxidantes protegendo macromoléculas celulares contra a oxidação por radicais livres durante o metabolismo normal, ou em condições adversas, como doenças, estresse ou poluição (Chen *et al*., 2004; Sado, 2008). Trutas arco-íris (*Oncohynchus mikyss*), suplementadas com altas doses de vitamina E apresentaram aumento da atividade de lisozima, produção de formas reativas de oxigênio por leucócitos do rim cefálico (Kiron *et al*., 2004). A vitamina C possui capacidade de aumentar a migração e fagocitose quando acrescentada em culturas de macrófagos do rim cefálico da dourada *Spaurus aurata*, além de aumentar o *burst* oxidativo dessas células (Mulero *et al*., 1998). Em truta arco-íris a suplementação da dieta com vitamina C induziu incremento do *burst* oxidativo e da atividade fagocítica (Verlhac *et al*., 1998). Lin e Shiau (2005)

observaram aumento na resistência à *Vibrio carchariae* em garoupas-malabar (*Epinephelus malabaricus*) alimentadas com dietas suplementadas com vitamina C, bem como aumento do *burst* oxidativo dos leucócitos do rim cefálico e da atividade de lisozima.

Na região amazônica, estudos sobre os efeitos de super doses de vitamina C na ração das espécies *A. gigas* e *B. amazonicus* demonstraram a importância deste nutriente como imunoestimulantes para estes peixes (Menezes *et al*., 2006; Andrade *et al*., 2007; Affonso *et al*,. 2007). Oliveira (2008) observou efeitos benéficos em juvenis de matrinxã alimentados com ração suplementada com diferentes concentrações de levamisol. Chagas (2010) observou efeitos positivos da administração de diferentes concentrações de glicano em juvenis de tambaqui. Isto têm estimulado novas pesquisas sobre os imunoestimulantes, principalmente, o levamisol e os glicanos, objeto do presente estudo.

7.1. Levamisol

O levamisol é um finimidazoltiazole sintético bastante utilizado em seres humanos e na medicina veterinária como agente antihelmíntico. Em peixes, o levamisol tem sido estudado e testado como agente não específico, atuando na reposta imune ou como acompanhante em vacinas (Anderson e Jeney, 1992; 1993; Oliveira, 2008). Esta substância tem sido apresentada como um imunoestimulante potente em diversas espécies aquáticas, atuando em adaptações das funções da células T (Renooux, 1980), na atividade citotóxica dos leucócitos (Cuesta *et al*, 2002), na fagocitose, no momento da respiração (Siwick, 1989; Mulero *et al.*, 1998; Findlay e Munday, 2002) e na ativação do fator de macrofágos (Mulero *et al*., 1998). Siwicki (1989) registrou aumento no número de leucócitos e na capacidade fagocítica de neutrófilos, assim como nos níveis de lisozima após administração oral de levamisol para carpas *Cyprinus carpio*. Kajita *et al*. (1990) observaram uma melhora na resposta imune não específica, como aumento da atividade fagocítica e de células *natural killer*, da concentração sérica de complemento e atividade bactericida, após injeção de levamisol, em truta arco-íris, *O. mikyss***,** durante o teste de desafio com cepas virulentas de *Vibrio angullarum*, cujos resultados demonstraram uma maior resistência a doença em relação ao grupo controle (sem levamisol). Sado (2008) observou a eficácia do levamisol em pacu, *P. mesopotamicus*, com dietas suplementadas com 100 mg de levamisol por um período de quinze dias. Apesar dessas evidências, é preciso cuidado quanto a utilização desses compostos químicos, já que seu efeito é dose-tempo dependente, isto é, altas doses podem causar um quadro de imunossupressão, assim como subdosagens podem não ser eficientes (Li *et al*.,

2004; Gatlin, 2002; Mulero *et al*., 1998; Anderson *et al*., 1989; Siwicki *et al.*, 1990; Kumari *et al.*, 2003, 2006).

O levamisol, quando administrado com vacinas para peixes, aumenta a resistência a estímulos patogênicos pelo aumento de uma resposta dos anticorpos e pelos parâmetros imunológicos não específicos, após administração *in vivo* por imersão (Jeney e Anderson, 1993) e injeção intraperitonial (Anderson e Jeney, 1992; Midtyling *et al*., 1996). Além disso, o levamisol tem sido utilizado de forma complementar para aumentar as produções de anticorpos *in vitro*, as atividade dos fagócitos e esplenócitos e superoxidar ânions da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Siwicki, 1989; Morrison *et al.*, 2001). Em matinxã, o levamisol mostrou resultados positivos na defesa orgânica dos peixes, pois o número de leucócitos e trombócitos aumentou após desafio com *A. hydrophila* (Oliveira, 2008).

7.2. Glicanos

Os glicanos são polissacarídeos de glicose que conferem rigidez à célula, protegem contra a tensão mecânica e determinam a forma celular. Estão presentes em duas formas: polímeros com ligações glicosídicas β-1,3, que confere rigidez à parede celular, e β-1,6, que aumenta a flexibilidade da parede celular (Manners *et al*., 1973).

Segundo Robertsen *et al.* (1990), os glicanos são os polissacarídeos estruturais mais importantes nas paredes celulares das bactérias, dos fungos e das plantas. Os glicanos, provenientes das leveduras, são os imunoestimulantes mais comumente utilizados na aquicultura, aumentando a eficiência imunitária não-específica por meio de uma capacidade oxidativa superior das células fagocitárias (Sealey e Gatlin, 1999). Segundo estes autores, o aumento fagocitário ocorre em função do aumento dos neutrófilos, monócitos, linfócitos e imunoglobulinas. Quando administrado internamente no organismo animal, o glicano é imediatamente identificado e pronto para agir assim que o animal necessitar, causando reações imunes (Kumar *et al*., 2005).

Alguns estudos têm mostrado o efeito dos glicanos na imunidade dos peixes (Robertsen, 1999; Sakai, 1999; Selvaraj *et al*., 2004; 2005; Dautremepuits *et al*., 2006; Ai *et al.*, 2007; Shorer, 2008; Chagas, 2010). Este imunoestimulante utilizado na dieta, antes e durante o estresse, pode aumentar, potencialmente, as taxas de resistência e sobrevivência dos peixes às doenças após o transporte ou a exposição à baixa qualidade de água (Jeney *et al.*, 1997; Palic, 2006). Injeções intraperitoniais com glicano em peixes demonstraram respostas imunes na atividade dos macrófagos (Jeney e Anderson, 1993; Jorgensen *et al.*, 1993), ativação do sistema complemento e aumento do nível de lisozima (Engastad *et al.*,

1992; Abreu, 2007). Quando administrados oralmente, os glicanos também são capazes de estimular as respostas imunes e a resistência à doenças em peixes (Raa *et al*., 1992; Siwicki *et al*., 1994).

A administração de ração com baixas dosagens de glicano estimula a fagocitose e atividade respiratória celular dos macrófagos renais, aumentando a imunidade dos peixes (Sakai, 1999; Robertsen, 1999). No entanto, os mecanismos exatos dos efeitos do glicano na imunidade dos peixes ainda não estão totalmente elucidados (Ai *et al.*, 2007).

Segundo Ai *et al.* (2007), os animais alimentados com altas dosagens de glicano apresentaram imunossupressão, resultados semelhantes foram apresentados em outros estudos (Robertsen *et al*., 1994, Castro *et al.*, 1999). Contudo, a atividade das lisozimas em peixes alimentados com altas dosagens de glicano foi maior, sugerindo diferentes respostas dos parâmetros imunológicos para cada dosagem de glicano (Schorer, 2008). De acordo com Sakai, (1999), para se obter melhores efeitos do glicano na imunidade dos peixes deve-se levar em consideração a administração, a dosagem e o regime alimentar desta substância para cada espécie.

O modo de ação do β 1,3 glicano tem início quando ele se liga a receptores específicos localizados na superfície dos macrófagos e cuja presença já foi sugerida para peixes (Engsad e Robertsen, 1993; Abreu, 2007). Na presença de um estímulo, a ligação β 1,3 glicano com o receptor resulta no aumento da atividade respiratória destas células, que por sua vez, desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio, com atividade bactericida (Verlhac e Gabaudan, 1997). Utilizando este mecanismo, o glicano age estimulando parte do sistema imune inato, levando ao aumento de algumas respostas imunes não específicas dos peixes e a proteção contra uma variedade de doenças (Jeney e Anderson, 1993; Verlhac *et al*., 1998; Bagni *et al*., 2005; Abreu, 2007).

Alguns estudos relatam os efeitos do glicano no aumento da atividade respiratória de fagócitos (Jeney e Anderson, 1993; Jorgensen *et al*., 1993) de alguns mediadores químicos solúveis, como proteínas do sistema complemento e lisozima. Exemplares da espécie *Ictalurus punctatus* tornaram-se resistentes à septicemia entérica quando injetados com β 1,3 glicano antes de serem submetidos à infecção pela bactéria *Edwardsiella ictaluri* (Chen e Ainsworth, 1992). Enquanto, *O. tshawytsha* alimentados com formulação comercial de glicano apresentaram maior resistência contra infecção pela bactéria *A. salmonicida* (Nikl *et al.*, 1993) e induziu aumento significativo na atividade de lisozima e complemento sérico em *Dicentrarchus labrax* (Bagni *et al*, 2005). Entretanto, em *Pagrus auratus* nenhuma diferença significativa foi encontrada na atividade das proteínas do sistema complemento (Cook *et al*.,

2003). Ortuño *et al*. (2003) observaram que a administração oral de leveduras ricas em glicano, aumentou as respostas imunes do *Spaurus aurata*. Quando administrado oralmente, o glicano provocou sua proteção efetiva em grande parte de espécies de peixes contra uma variedade de bactérias patogênicas como *A. hydrophila* (Kwak *et al.*, 2003; Selvaraj *et al*., 2008), *E. tarda* (Sahoo e Mukherjee, 2002) e *Vibrio salmonicidade* (Raa *et al*., 1992). No presente estudo foi utilizada como agente estressor a bactéria Gram-negativa *Aeromonas hydrophila*.

8. Referências Bibliográficas

Abreu, J. S., Urbinati, E. C. 2006. Physiological responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*) fed different levels of vitamin C and submitted to air exposure. *Acta Amazônica*, 36(4): 519 – 524.

Abreu, J.S. 2007. *Suplementação alimentar de pacu (Piaractus mesopotamicus Holmberg 1887) com β 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura*. Tese de Doutorado Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 123p.

Abreu, J.S; Marzocchi-Machado, C.M.; Urbaczek, A.C.;Fonseca, L.M.; Urbinati, E.C. 2009. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Brazilian Journal Biology*, 69(4): 1133-1139.

Affonso, E.G.; Menezes, G.C.; Ono, E.; Roubach, R.; Andrade, J.I.A.; Ituassú, D.R.; Brasil, E.M. 2005. Efeito das dietas suplementadas com vitaminas C, E e C+E nas respostas fisiológicas do pirarucu, *Arapaima gigas*, (Cuvier, 1829) criado em tanques-rede. *Anais do VII Congresso Internacional de Zootecnia*. 2005. Campo Grande, MS.

Affonso, E.G.; Silva, E.C.; Tavares-Dias, M.; Menezes, G.C.; Carvalho, C.S.M.; Nunes, E.S.S.; Ituassú, D.R.; Roubach, R; Ono, E.A.;. Fim, J.D.I.; Marcon. J.L. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses R.R of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comparative Biochemistry Physiology A*, 147: 383-385.

Ai, Q.; Mai; K.; Zhang, l.; Tan, B.; Zhang, W.; Xu, W.; Li, H. 2007. Effects of dietary β-1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*. 22: 394-402.

Anderson, D.P. e Jeney, G. 1992. Immunostimulants added to injected Aeromonas salmonicida bacterin enhances the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 34:379-389.

Anderson, D.P.; Siwicki, A.K.; Dixon, O.W.; Lizzi, E.F. 1989. Immunostimulation by levamisole in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in vivo. In: *Viruses of Lower Vertebrates* (ed. by W.Ahne e E. Kurstak). springer-Verlag, New York, USA. p. 469-78.

Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Brasil, E.; Matsura T.; Affonso, E.G. 2006. Influência da vitamina C na dieta da matrinxã, (*Brycon amazonicus*) após infecção por Aeromonas hydrophila. In: *Anais da X Jornada de Iniciação Científica*, PIBIC/INPA, Manaus.

Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Menezes, G.C.; Brasil, E.M.; Roubach, R.; Urbinati, E.C.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comparative Biochemistry Physiology,* 146: 576-580

Bagni, M.; Romano, N.; Finola, M.G.; Abelli, L.; Sacapigliati, G.; Tiscar, P.G.; Sarti, M., Marino, G. 2005. Short-and long-term effects of a dietary y cast beta-glucan (Mcrogard) and alginicacid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 311-325.

Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. 2005. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Ed. UFSM – Santa Maria. 468p.

Baldisserotto, B. 2002. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: Ed. UFSM, 212 p.

Barcellos, L.J.G.; Woehl, V.; Wassermann, G.F.; Quevedo, R.M. Ittze, I.; Krieger, M.H. 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamidia quelen* (Quoy e Gaimard), a Soult American catfish. *Aquaculture Research.* 32: 121-124.

Barton, B.A.; Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Review of Fish Diseases.* 1: 3-26.

Bendach, F.; Urbinati, E.C. 2009. Calcium sulphate as stress reducer in matrinxã (*Brycon amazonicus*) transportation. *Journal of Applied Ichthyology.* 25: 201-205.

Biller, J.D. 2008. *Respostas fisio-patológicas e desafio por Aeromonas hydrophila em pacu alimentado com ração suplementada com β 1,3 glicano.* Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo. 114p.

Brandão, F.R.; Gomes, L. C.; Chagas, E.C. 2006. Resposta de estresse em pirarucu, *Arapaima gigas*, durante prática de rotina de piscicultura. *Acta Amazônica*. 8: 349-356.

Brandão, F.R.; Gomes, L.C.; Chaga, E.C.; Araújo, L.D. 2004. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanque-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 39: 357-362.

Brandão, F.R.; Gomes, L.C.; Chagas, E.C.; Araujo, L.D.; Silva, A.L.F. 2005. Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 40(3): 299-303.

Bricknell, I.; Dalmo, R. A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*. 19: 457-472.

Burrells, C., Williams, P.D.; Southgate, P.J.; Wadsworth, S.L. 2001. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds: 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture.* 199: 171-184.

Bush, A.O.; Lafferty, K.D.; Lotz, J.M.; Shostak, W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al*. Revisited *Journal Parasitology*. 83(4): 575-583.

Carneiro, P.C.F.; Kaiseler, P.H.F.; Swarofsky, E.A.C.; Baldisseroto, B. 2009. Transport of jundiá *Rhamdia quelem*, juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. *Neotropical Ichtyology*. 7: 283-288.

Carneiro, P.C.F.; Urbinati, E.C. 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. *Aquaculture Research*. 32: 297-3004.

Carneiro, P.C.F.; Urbinati, E.C.; Martins, M.L. 2002. Transport with different benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869)(Teleostei: Characidae). *Acta Scientiarum*. 24(2): 555-560.

Carvalho, C.S.; Fernandes, M.N. 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture***.** 251(1): 109-117.

Carvalho-Casto, G.A; Lopes, C.O; Leal, C.A.G; Cardoso, P.G; Leite, R.C.; Figueiredo, H.C.P. 2010. Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydropila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*. 144: 371-376.

Castagnolli, N. 1992. *Piscicultura de água doce.* FUNESP. Jaboticabal, 189p.

Castagnolli, N. 2004. Estado da arte da aquicultura brasileira. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Ed) *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo.

Castro, R., Couso, N., Obach, A., Lamas, J. 1999. Effect of different β-glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream(*Spaurus aurata*) phagocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 529-541.

Cavero, B.A.S., Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Ituassú, D.R.; Gandra, A.L.; Crescêncio, R. 2003. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu, em ambiente confinado. *Pesquisa agropecuária Brasileira,* 8(1):103-107.

Chagas, E.C. 2010. *B-glucano e nucleotídeos para tambaquis (Colossoma macropomum) vacinados e desafiados com Aeromonas hydrophila: Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 141p.

Chagas, E.C.; Gomes, L.C.; Martins Junior, H.; Roubach, R. 2007. Produtividade de tambaqui criado em tanque-rede com diferentes taxas de alimentação. *Ciência Rural*. 37: 25-35.

Chagas, E.C.; Lourenço, J.N.P.; Gomes, L.C.; Val, A.L. 2003. Desempenho e estado de saúde de tambaquis cultivados em tanques-rede sob diferentes densidades de estocagem. In: Urbinati, E.C. Possebon-Cyrino, J.E. (Ed) *Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura.*

Chen, D., Ainsworth, A.J. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafisneque. *Journal Fish Disease*. 15: 295-304.

Chen, R. Locchmann, R., Goodwin, A., Pravenn, K., Dabrowskik, K., Lee, K.J. 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*. 242: 553-569.

Cook, M.T.; Hayball, P.J.; Hutchinson, W.; Nowak, B.F.; Hayball, J.D. 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoAtiva^{TM} as feed supplement enhances

macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper, *Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider) in winter. *Fish & Shellfish Immunology*. 14: 333-345.

Cuesta, A.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. 2002. Levamisole is potent enhancer of gilthead sea bream natural cytotoxic activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 89:169-174.

Dautremepuits, C.; Fortier, S.; Croisetiere, P.; Belhumeur e fournier, M. 2006. Modulation of juvenile broock trout (*Salvelinus fontinales*) cellular immune system after *Aeromonas salmonicida* challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110: 27-36pp.

Davis, K.B.; Griffin, B.R.; Gray, W.L. 2002. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalarus punctatus* to *Ichthyophtirius multifilus* and catfish virus infection. *Aquaculture*. 214:55-66.

Eddy, F.B. 1981. Effects os stress on osmotic and ionic regulation in fish. In A. D. Pickering editor. *Stress in Fish*. Academic Press, London. 77-102p

Emanata, A.C. 2000. Live transport of pond-reared milkfish *Chanos chanos* broodstock. *Journal of the World Aquaculture Society* 31:279-282.

Engastad, R. E.; Robertsen, E.; Frivold, E. 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmo blood. *Fish & Shellfish Immunology*. 2: 287-297.

FAO, 2010. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, 2010.

Findllay, V.L.; Munday, B.L. 2002. The immunomodulatory effects of levamisole on the non-specific immune system of Atlantic salmon, *salmon salar L*. *Journal of fish Diseases*. 23: 369-378.

Gandra, A.L. 2010. *O mercado de pescado da região metropollitana de Manaus*. Proyecto: Mejoramento del Acceso los Mercados de Productos Pesqueros y Acuículas CFC/FAO/INFOPESCA. CFC/FSCFT/28.

Gatlin III, D.M., Li, P., Wang, X., Burr, G.S., Castille, F. Lawrence, A.L. 2006. *Potential application of prebiotics in aquaculture.* In. Simposium International de Nutricion Acuicula, 8. Monterrey. Avances em nutricion acuicula. 371-376.

Gomes, L.C.; Urbinati, E.C. 2005. Matrinxã (*Brycon cephalus*). In: Baldisserotto, B.; Gomes, L. C. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Editora UFSM. cap. 7, p. 149-174.

Gomes, L.C.; Brandão, F.R.; Chagas, E.C.; Ferreira, M.F.B.; Lourenço, J.N.P. 2004. Efeito do volume do tanque-rede na produtividade do tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante a recria. *Acta Amazônica*. 34: 111-113.

Gomes, L.C.; Chagas, E.C.; Brinn, R. P.; Rooubach, R.; Coppati, E. C.; Baldisserotto, B. 2006. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture.* 256: 521-528.

Gomes, L.C.; Golombieski, J.I.; Chippari-Gomes, A.R. ; Lopes, N.P.; Roubach, R.; Araujo-Lima, C.A.R.M. e Urbinati, E.C. 2003. Effect of fish density on the stress physiological responses and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum* during transportation. *Journal of the World Aquaculture Society,* 34 (1): 76-84.

Grottum, J.A.; Staurnes, M. e Sigholt, T. 1997. Effect of oxugenation, aeration and ph control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), kept at high densities during transport. *Aquaculture Research* 28: 159-164.

Henre, G. I. Krogdahl, A. 1996. Effect of handling and size on secondary changes in carbohydrate metabolism im Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*. 2.249-252.

Hesser, E.F. 1960. Methods for routine on fish haematology. *The Progressive Fish Culturist,* 22: 164-171.

Huttenhuis, H.B.T.; Ribeiro, A.S.P.; Bowden, T.J.; Bavel, C.V.; Taverne-Thiele, A. J.; Rombout, J. H.W.M. 2006. The effect of oral immuno-stimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio L.*). *Fish & Shellfish immunology*. 20: 1-11.

Inoue, L.A.K.A.; Hackberth, A.; Moraes, Gilberto. 2010. Benzocaína sobre respostas ao estresse do matrinxã submetido ao transporte em sacos plásticos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 11(3): 909-918.

Isaac, V.J.; Ruffino, M.L. 1996. Population dynamics of tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, in Lower Amazon, Brasil. *Fisheries Managemen*t *and Ecology*, 3: 315-333.

Jeney, G. e Anderson, D.P. 1993. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. *Fish & Shellfish Immunology*. 3: 51-58.

Jeney, G.; Galeotti, M.; Volpatti, D.; Jeney, Z.; Anderson, D.P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154(1):1-15.

Jorgensen, J. B.; Sharp, J. E.; Secombs, C.J.; Robersen, B. 1993. Effect of a yast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish & Sellfish Immunology*. 3: 267-277.

Kajita, Y.; Sakai, M.; Atsuta, S.; Kobayashi, M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathology*. 25: 93-98.

Kiron, V.; Puangkaew, J.; Ishizak, K.; Satoh, S.; Watanabe, T. 2004. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture*, 234: 361-379.

Kubitza, F. Transporte de peixes vivos. 1997. Parte 1. *Panorama da Aqüicultura.* 7: 20-26.

Kubitza, F. 2010. Cultivo de tilápia em tanques-rede: Como o atraso nas vendas, falta de planejamento e enfermidades podem impactar o custo de produção. *Panorama da Aqüicultura,* 20 (120): 14-23.

Kumar, R.; Singh, R.D.; Sharma, K.D. 2005. Water resources of India. *Current Science*, 89: 794-811.

Kumari, J.; Swain, T.; Sahoo, P.K. 2003. Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistence in Asian catfish, *Clarias batracus. Veterinary immunology and Immunopatology*. 94: 1-9.

Kumari, J; Sahoo, P. K. 2006. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus (Linnaeus)*. *Aquaculture Rese*arch. 37: 500-509.

Li, G.; Guo, Y.; Zhao, D.; Qian, P.; Sun, J.; Xiao, C.; Liang, L.; Wang, H. 2006. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fuscus*. *Aquaculture*. 256: 212-217.

Li, P.; Lewis, D.H.; Gatlin III, D.M. 2004. Dietary oligonucleotide fron yeast RNA influences immune responses and resistence of hybrid striped bass (M*orone chrysops x M. saxatili*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 16: 561-569.

Li, P.; Wang, X.; Gatlin III, D.M. 2006. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture*, 251: 201-209.

Lim, L.C.; Dher, P.; Sorgeloos, P. 2003. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research*. 34(11): 923-935.

Lin, Y.H.; Shiau, S.Y. 2005. Dietary vitamin E requirement of grouper *Epinephelus malabaricus* at two lipid levels and their effects on immune responses. *Aquaculture*, 248: 235-244.

Manners, D.J.; Masson, A.J.; Patterson, J.C.; Bjorndal, H. e Lindberg, B. 1973. The structure of a β-(1-)-D-glucan from yeast cell walls. *Journal of Biochemical*, 135: 31-36.

Martins, M.L. 2000. *Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1817) estressados*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 125p.

Mazeaud, M. M.; Mazeaud, F.; Donaldson, E. M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new ata with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*.106: 201-212.

Melo, L.A.S.; Izel, A.C.U.; Rodrigues, F.M. 2001. *Criação de tambaqui (Colossoma macropomum) em viveiros de argila/barragens no estado do Amazonas*. Embrapa Amazônia Ocidental. 25p

Menezes, G.C.; Tavares-Dias, M.; Ono, E.A.; Andrade, J.I.A; Brasil, E.M.; Roubach, R.; Urbinati, E.C.; Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2006. The influence of dietary vitamina C and E suplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comparative Biochemistry Physiology*. 145(2): 274-279.

Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. 2010. *Produção Pesqueira e Aquícola: Estatística 2008 e 2009*. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília.

Momnsen, T.; Vijayan, M.; Moon, T. 1999. Cortisol in teleost. dynamics, mechanism of action and metabolic regulation. *Reviews in fish Biology and Fisheries*, 9:211-268.

Monteiro, D.; Marrero, M.; Izquierdo, M.S.; Robaina, L., Vergara, J.M; Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation in some immune parameters of gilthead seabream (*Spaurus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*. 171: 269-278.

Morata, P.; Faus, M.J.; Perez-Palomo, M.; Sanches-Medina, F. 1982. Effect of stress on liver and muscle glycogen phosphorylase in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemical Physiology B*, 78: 421-425.

Morgan, J.D.; Iwama, G.K.; 1997. Measurements of stressed states in the field. *In* Iwama, G.W.; Pickering, A.D.; Sumpter, J.P.; Schreck, C.B. (Eds.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 247-270.

Morrison, R.N.; Nowak, B.F.; Carson, J. 2001. The histopathological effects of a levamisole-adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture.* 195: 23-33.

Mulero, V.; Esteban, M.A.; Munoz, J.; Meseguer, J. 1998. Dietary intake of levamisole enchances the immune rresponse and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Spars aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 8: 49-62.

Nilk, L.; Evelyn, T.P.T; Albright, L.J. 1993. Trials with on orally and immersion administered beta 1,3 glucan as an immuno prophylacti against *Aeromonas salmonicidae* in juvenile chinook salmon *Oncrhynchus tshawytscha*. *Disease of Aquatic Organisms*, 17: 191-196.

Nunes, E.S.S. 2010. *Efeito do sal (NaCl) e do gesso ($CaSO_4$) nas respostas metabólicas ao estresse do matrinxã, Brycon amazonicus, durante e após o transporte*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 50p.

Oliveira, S.R. 2008. *Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse de transporte do matrinxã, Brycon amazonicus*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 117p.

Ono, E.A, Kubitza, F. 2003. *Cultivo de peixes em tanques-rede*. 3a ed. Ono, E.A, Jundiaí, São Paulo, 170p.

Ono, E.A. 2005. Cultivar Peixes na Amazônia: Possibilidade ou Utopia? *Panorama da Aqüicultura*. 15:41- 48.

Palic, D., Andreasen, C. B., Herolt, D. M., Menzel, B. W., Roth, J. A. 2006. Immunomodulatory effects of β-glucan on neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820) *Developmental & Comparative Immunology*. 30: 817-830.

Pavanelli, G.C.; Eiras, J.C.; Takemoto, R.M. 2010. *Doenças de peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento*. 2ª Ed. Eduem, Maringá. 305p.

Pickering, A.D. 1981. *Stress and Fish*. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 1-9.

Raa, J.; Rostad, G.; Engstad, R.; Robertson, B. 1992. The use of immunostimulants to increase resitance of aquatic organisms to microbial infections. In: sheriff, M.; Subasinghe, R.P.; Arthur, J.R. (Eds) *Diseases in Asian Aquaculture*. Manila: Fish health section. *Asian fisheries Society*, 39-50p.

Razani-Paiva, M.J.T.; Ishikawa, C.M.; Eiras, A.C.; Silveira, V.R. 2004. Effects of experimental challenge with Mycobacterium marinum on the blood parameters of nile-tilápia, *Oreochromis noloticus* (Linnaeus, 1757). *Brazilian Archive Biology Technology.* 46: 945-953.

Robertsen, B. 1999. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish & Shellfish Immunolog*y, 9: 269-290.

Robertsen, B.; Rostard, G.; Engstad, R.; Raa, J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistence in Atlantic salmon, *Salmo salar L*., by a glucan fron *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal Fish of Disease*. 13: 391-400.

Sadler, J.; Wells, R.M.G.; Pankhurst, P.M.; Pankhurst, N.W. 2000. Blood oxygen transport, rheology and hematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo solar*. *Aquaculture.* 184: 349-361.

Sado, R.Y. 2008. *Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887)*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo –Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz. Piracicaba - SP. 136p.

Sahoo, P.K.; Mukherjee, S.C. 2002. The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). *Fish & Shellfish Immunology*. 12: 1-16.

Saint-Paul, U. 1986. Potential for aquaculture of south American freshwater fishes; a rewiew. *Aquaculture Amsterdam*. 54: 205-240.

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.

Santos, C. 2009. *Aquicultura e pesca: a mudança do modelo exploratório*. In: Tavares-Dias, M. Manejo e Sanidade em peixes de cultivo. Embrapa Amapá. Macapá. CDRom.

Schorer, M. 2008. *Utilização do β-glucano sobre o desempenho produtivo, indicadores de estresse, perfil hematológico e sobrevivência do pacu, Piaractus mesopotamicus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo. 96p.

Sealey, W.M.; Gatlin, D.M. 1999. Overview of nutritional strategies affecting health of marine fish. *Journal of Applied Aquaculture*, 9(2): 11-27.

Secombs, C.J. 1994. Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 4: 421-436.

SEPA/SEPROR. 2010. *Integração dos setores agropecuário, florestal e pesqueiro: Cadeia produtiva da pesca e aqüicultura.* Secretaria Estadual da Pesca e Aquicultura, Amazonas.

Selvaraj, V.; Sampath, K.; Sekar, V. 2004. Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Aeromonas hydrophila* and its effects on survival and hematology of the carp, *Cyprinus carpio*. *Asian Fish Science*. 17: 163-173.

Selvaraj, V.; Sampath, K.; Sekar, V. 2008. Adjuvant and immunostimulatory effects of β-glucan administration in combination with lipopolysaccharde enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 114: 15-24.

Selvaraj, V.; Sampath, K.; Sekar, V. 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19: 293-306.

Silva, A.M.D; Gomes, L.C.; Roubach, R. 2007. Growth, yield, water and effluent quality in ponds with different management during tambaqui juvenile production. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 42(5): 733-740.

Siwicki, A.K. 1989. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Developmental and Comparative Immunology*, 13: 87-91.

Siwicki, A.K.; Anderson, D.P.; Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41: 125-139.

Siwicki, A.K.; Zakes, Z.; Terech-Majewska, E.; Kowalaska, A.; Malaczewska, J. 2009. Supplementing the feed of pickeperch (*Sander lucioperca* (L)) juveniles with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms. *Aquaculture Research*, 40: 405-411.

Skjermo, J., Bergh, O. 2004. High-M alginate immunostimulation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae using Artemia for delivery increases resistance against vibriosis. *Aquaculture*. 238:107-113.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Villimpress. 143p.

Tavares-Dias, M.; Ishicawa, M.M.; Martins, M.L.; Satake, F.; Hisano, H. Pádua, S.B.; Geronimo, G.T.; Santana, A.R. 2009. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixe em cultivo. In: Saran-Neto, M.; Pozzobon-Soria, W.S. (eds) *Tópicos especiais em saúde e criação animal*. São Carlos: Pedro e João editores. 43-72p.

Tavares-Dias, M; Moraes, F.R. 2010. Biochemical parameters for *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* (Characidade) and hybrid tambacu (*P. mesopotamicus x C. macropomum*). *Ciência Animal Brasileira*, 11(2): 363-368.

Tavares-Dias, M.; Schalch, S.H.C.; Martins, M.L., Silva, E.D.; Moraes, F.R.; Perecin, D. 1999. Hematologia de teleósteos brasileiros co infecção parasitária. I. variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). *Acta Scientiarum*, 21(2):337-342.

Tsuzuki, M.Y.; Ogawa, K.; Strüssmann, C.A.; Maita, M.; Takashima, F. 2001. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*. 200: 349-362.

Urbinati, E.C.; Abreu, J.S.; Camargo, A.C.S. e Landines, M.A. 2004. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. *Aquaculture*. 229: 389-400.

Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*. 155: 401-417.

Val, A.L.; Almeida-Val. V.M.F. 1995. *Fishes of the Amazon and Their Environment: Physiological and Biochimical Aspects*. Berlin: Springer Verlag. 245 p.

Verlhac, V., Gabaudan, J. 1997. *The effect of vitamin C on fish health*. Brochure nº 51002. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland.

Verlhac, V.; Obach, A.; Gabaudan, J.; Schuep, W.; Hole, R. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*. 8: 409-424.

Waltrick, V.P. 2007 *Avaliação ambiental de igarapés influenciados pela criação de matrinxã (Brycon amazonicus) e por peixes ornamentais em Manaus – AM*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas.

Wedemeyer, G. A. 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Nova York: Chapman & Hall. 232 p.

Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. 77: 591-625.

Weys, F.A.A.; Verburg-Van Kemenade, B.M.L. Flik, G. 1998. Characterisation of glucocorticoid receptors in peripheral blood leukocytes of carp, *Cyprinus carpio L.*: cortisol effect on the carpio blood. *General and Comparative. Endocrinology*. 125: 176-183.

Wojtaszek, J.; Dziewueska-Szwajkowska, D.; Lozinska-Gabska, M.; Adamowiez, A.; Dzugaj, A. 2002. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio L.*): Cortisol Effect on the carp Blood. *General and Comparative Endocrinology*. 125(2): 176-183.

Wurts, W. A. 1995. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. *World Aquaculture*, 26: 80-81.

OBJETIVOS

Avaliar a eficácia dos imunoestimulantes levamisol e glicano, adicionados à dieta, para a melhoria do desempenho zootécnico e como mitigador do estresse no transporte e no pós-transporte de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

a) Determinar a dose letal (DL_{50} - dose letal para 50% da população) da bactéria *Aeromonas hydrophila* para tambaqui;

b) Avaliar os efeitos dos imunoestimulantes levamisol e do glicano nas respostas fisiológicas dos juvenis de tambaqui, após infecção causada pelas bactérias Gram-negativas *A. hydrophila*;

c) Testar a eficiência dos imunoestimulantes levamisol e glicano como medida profilática para o tambaqui em sistema de cultivo intensivo em tanques-rede;

d) Avaliar a eficiência dos imunoestimulantes levamisol e glicano como mitigador do estresse causado durante e após o transporte.

CAPÍTULO 1

Tolerância do tambaqui (*Colossoma macropomum*) a bactéria gram-negativa *Aeromonas hydrophila*

Normas de acordo com a Revista da Acta Amazonica

Tolerância do tambaqui (*Colossoma macropomum*) a bactéria gram-negativa *Aeromonas hydrophila*

Ana Maria Dias da SILVA e-mail: anadias17@hotmail.com

Marcio Quara de Carvalho SANTOS e-mail: marcioquara@hotmail.com

Elenice Martins BRASIL e-mail: nice@hotmail.com

Jaqueline Inês Alves de ANDRADE e-mail: jaque_bio@hotmail.com

Elizabeth Gusmão AFFONSO e-mail: pgusmao@hotmail.com

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Av. André Araújo, 2936, Aleixo. Caixa Postal: 478, CEP: 69060-0001 – Manaus, Amazonas. Brasil

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a dose letal (96-h DL_{50}) da bactéria *Aeromonas hydrophila* para o juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Foram utilizados 72 juvenis de tambaqui com peso médio de 61,4 ± 10,88 g, divididos em 4 tratamentos com três réplicas cada, e inoculados com diferentes soluções bacterianas: TR_1 - Controle (solução salina 0,85% NaCl); TR_2 (2,736 x 10^{10} UFC mL^{-1}); TR_3 (2,736 x 10^{11} UFC mL^{-1}) e TR_4 (2,736 x 10^{12} UFC mL^{-1}). Os peixes foram previamente anestesiados com benzocaína (60 mg L^{-1}), inoculados com as suspensões bacterianas na cavidade celomática e distribuídos em 12 aquários de vidro de 80 L de capacidade, num sistema estático e aeração constante. O comportamento, a mortalidade e a qualidade da água foram monitoradas por 96 horas. A DL_{50} foi estimada de acordo com o método Spearman-Karber. Os parâmetros físicos e químicos da água permaneceram dentro das condições consideradas adequadas para o desenvolvimento e saúde dos peixes. A mortalidade dos peixes aumentou nas concentrações crescentes de *A. hydrophila* (TR_1 = 0,0%; TR_2 = 16,6%; TR_3 = 50,0% e TR_4 = 100,0%. Os primeiros sinais da ação bacteriana foram observados 12 h após a inoculação, enquanto que as primeiras mortalidades ocorreram somente após 24 horas. Os resultados demonntraram a alta tolerância do tambaqui à bactéria *A. hydrophila* comparada a outras espécies de peixes. A 96-h DL_{50} foi 2,46 x 10^{11} UFC de *A. hydrophila* mL^{-1} de solução salina.

Palavras-chave: bactéria patogênica, 96-h DL_{50}, peixes tropicais, tolerância

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the lethal dose of *Aeromonas hydrophila* to juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) to support later challenges studies in this species. Seventy two juveniles with average weight 61,4 ± 10,88 g were placed in twelve groups to perform four treatments with three repetitions each: T_1 - Control (saline solution 0,85% NaCl); T_2 (2,736 x 10^{10} UFC.mL^{-1}); T_3 (2,736 x 10^{11} UFC.mL^{-1}) e T_4 (2,736 x 10^{12} UFC.mL^{-1}). Fish were previously anesthetized in benzocaine bath (60 mg.L^{-1}), and bacteria solutions were injected in the celomatic cavity, and fish respectively distributed in twelve 80 L glass aquaria with constant aeration. Mortalities and water quality were monitored during 96 h. LD_{50} was determined in accordance with Spearman-Karber method. Water quality parameters kept in values considered adequate to fish, but fish mortalities increased as *A. hydrophila* concentrations rised (T_1 = 0,0%; T_2 = 16,6%; T_3 = 50,0% e T_4 = 100,0%). The first signs of bacteria injections were observed 12 h after inoculation as mortalities in 24 h. Results suggest juvenile tambaqui is very tolerant to *A. hydrophila* compared to other fish species. The lethal dose (96-h LD_{50}) was 2,46 x 10^{11} UFC de *A. hydrophila*.mL^{-1}.

Keywords: pathogen bacterium culture, LD_{50}, tropical fishes

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos que possam prevenir doenças, ao mesmo tempo que maximizam a resistência imunológica em peixes, têm sido medidas importantes adotadas em grandes pisciculturas que visam aumentar e melhorar a produção (Sakai *et al*., 2001; Sahoo e Murkherjee, 2003; Oliveira, 2008; Oliveira *et al*., 2011). Várias substâncias, com características imunoestimulantes, têm sido utilizadas para melhorar o sistema imune dos animais, estimulando a atividade bactericida de células fagocitárias, como macrófagos, neutrófilos e monócitos, promovendo a produção de células citótoxicas não específicas, anticorpos e lisozimas (Sakai, 1999; Biller, 2008).

Para avaliar a eficácia e a segurança de novos produtos na piscicultura, são utilizados testes de desafio, normalmente utilizando bactérias patogênicas como agente estressor, pela praticidade das técnicas e pela qualidade dos resultados. Na literatura são descritos inúmeros testes de desafio com bactérias por meio de injeções intraperitoneais (Kodama *et al*., 2007; Sahu *et al*., 2007; Oliveira *et al*., 2011).

Os testes de toxicidade aguda ou testes desafio de uma substância devem ser estimados por DL_{50} que é a dose capaz de causar a morte de 50% da população exposta a determinado produto durante um tempo específico. A DL_{50} é usada para estabelecer as medidas de segurança a serem seguidas para reduzir os riscos que o produto a ser testado pode apresentar na saúde do animal (Zacarias e Santos, 2009).

As bactérias do gênero *Aeromonas* são comumente utilizadas para este fim em função de sua ampla distribuição nos ambientes aquáticos e por serem tipicamente oportunistas, podendo infectar qualquer espécie de peixe, além de serem responsáveis por perdas consideráveis na aquicultura (Razani-Paiva, 2004; Pavanelli, 2010). Essas bactérias são gram-negativas, anaeróbias facultativas e não formadoras de esporos (Roberts *et al*., 1996).

As bactérias do gênero *Aeromonas* utilizam a matéria orgânica em decomposição na água, para seu crescimento e multiplicação (Boijink e Brandão, 2001). Em sistemas de produção, estes microrganismos podem causar vários danos aos peixes sob condições de estresse (Moraes e Martins, 2004; Pavanelli, 2010). Condições desfavoráveis como grande quantidade de matéria orgânica no ambiente de cultivo e elevada temperatura da água que aliadas a fatores estressantes, tais como: transporte, alta densidade de estocagem, traumatismos decorrentes de manuseio inadequado, hipóxia, deficiências nutricionais e infecções por fungos e parasitas, contribuem para mudanças fisiológicas e aumento da suscetibilidade dos peixes à infecção (Costa, 2004; Oliveira, 2008).

O crescimento contínuo da piscicultura na região amazônica nos últimos anos, assim como o aumento na incidência de doenças, têm estimulado a realização de pesquisas visando à adição de novos produtos que melhorem a resistência imunológica dos peixes em condições de cultivo (Findlay e Munday, 2000; Sakai *et al.*, 2001; Sahoo e Murkherjee, 2003; Rao e Chakrabarti, 2005; Chakrabarti e Rao, 2006). Para avaliar a eficácia e segurança de novos produtos é necessária a realização de testes de desafio, utilizando, principalmente, bactérias patogênicas como agente estressor, devido à praticidade das técnicas e da qualidade dos resultados (Oliveira *et al.*, 2011). Para isso, é necessária a obtenção de informações sobre os limites de tolerância (96-h DL_{50}) da espécie ao patógeno testado. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo a determinação da 96-DL_{50} da *A. hydrophila* para juvenis de tambaqui, visando sua aplicação em futuros testes de desafio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e aclimatação dos peixes.

Os peixes foram obtidos na Piscicultura Santo Antonio, localizada na rodovia AM 010, km 112, município de Rio Preto da Eva, AM e transferidos para a Estação Experimental

de Piscicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, onde foram mantidos em viveiros escavados de 150 m² e foram alimentados com ração extrusada contendo 36% de proteína bruta moída até atingirem um peso médio de aproximadamente 60 gramas.

2.2. Origem das bactérias e preparo das suspensões bacterianas

Foi utilizada a cepa patogênica de *A. hydrophila* obtida no Centro de Aquicultura da UNESP/CAUNESP (Jaboticabal/SP). Para a preparação das diferentes concentrações das soluções bacterianas, a bactéria foi reativada em meio de cultura caldo nutritivo e incubada a 30ºC, durante 24 horas. Posteriormente, as bactérias reativadas foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton pela técnica de *spread-plate* e incubadas a 30ºC, durante 24 horas. Em seguida, foi realizada a contagem das células bacterianas em microscópio óptico com aumento de 400 vezes, utilizando-se 10 µL da diluição na câmara de Neubauer, segundo o método modificado por Koch (1994). Para calcular o número de células por mL foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Nº de células} = \frac{\text{Total de bactérias contadas x Fator de diluição x 4 x } 10^8}{\text{5 (nº de quadrantes) x 100 (profundidade da câmara)}}$$

Para a determinação do inócuo a ser utilizado no desafio experimental, foram utilizadas as seguintes diluições: $2{,}736 \times 10^{10}$ UFC mL^{-1}; $2{,}736 \times 10^{11}$ UFC mL^{-1} e $2{,}736 \times 10^{12}$ UFC mL^{-1} de bactéria *A. hydrophila*. Após a preparação das diluições das bactérias, as soluções foram injetadas dentro da cavidade celomática dos peixes.

2.3. Delineamento experimental

Os exemplares juvenis de tambaqui (n = 72) com peso médio de 61,4 ± 10,8 g, foram mantidos em jejum por um período de 24 h para esvaziamento do trato gastrointestinal. Em

seguida foram divididos em 4 grupos com três réplicas cada e inoculados com diferentes soluções bacterianas: TR_1 - Controle (solução salina 0,85% NaCl); TR_2 ($2{,}736x10^{10}$ UFC.mL^{-1}); TR_3 ($2{,}736x10^{11}$ UFC.mL^{-1}) e TR_4 ($2{,}736x10^{12}$ UFC.mL^{-1}). Os peixes foram previamente anestesiados com benzocaína (60 mg.L^{-1}), inoculados com as suspensões bacterianas na cavidade celomática e distribuídos em 12 aquários de vidro com capacidade para 80 L, em sistema semi-estático e com aeração constante. Durante um período de 96 h, os peixes não foram alimentados, sendo observada a mortalidade dos animais e monitorada a qualidade da água.

2.4. Monitoramento da qualidade de água

A qualidade da água de cada aquário foi monitorada diariamente às 9:00 h e, após a amostragem da água de cada aquário, foram feitas trocas de 1/3 da água para evitar que sua deterioração influenciasse os resultados.

Oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica foram determinadas utilizando um medidor multiparamétrico digital da marca YSI (Yellow Spring Instruments) modelo 85/10; e o pH medido com um medidor de pH digital da marca YSI modelo 60/10. As concentrações de amônia total (NH_3 + NH_4^+) foram determinadas pelo método colorimétrico, segundo Verdouw *et al*. (1978), e as absorbâncias foram obtidas usando um espectrofotômetro da marca Bioplus 2000. Os valores de amônia tóxica foram calculados como descrito em Kubitza (2003).

A determinação da concentração de nitrito (NO_2^-) na água foi realizada pelo método colorimétrico de Boyd e Tucker (1992) e as absorbâncias foram lidas no mesmo espectrofotômetro descrito acima. A alcalinidade total e a dureza total foram determinadas por meio de titulação descrita por Boyd e Tucker (1992). A alcalinidade total foi determinada usando o indicador metil-laranja, titulando-se a amostra com uma solução de H_2SO_4 e a

dureza total da água foi feita utilizando como indicador o eriocromo-negro. O gás carbônico foi feito segundo Boyd e Tucker (1992), porém, utilizando uma adaptação para o mínimo contato com o ar atmosférico. Para isso, foram utilizadas seringas de 10 mL, para a retirada das amostras sem contato com o ar. Foi utilizado como indicador a fenolfetaleina e como titulante, o carbonato de sódio.

2.5. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e a 96h- DL_{50} foi estimada através do método de Spearman-Karber, segundo Hamilton *et al*. (1977).

Os resultados da qualidade da água foram comparados mediante a análise de variância (ANOVA). Quando os tratamentos apresentaram diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. Ambas as análises foram realizadas a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Qualidade da água

As variáveis oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica, pH, alcalinidade, dureza e CO_2 não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p<0,05$) entre os tratamentos, enquanto que as concentrações de amônia e de nitrito aumentaram significativamente na água dos peixes infectados com a maior concentração bacteriana (Tabela 1).

3.2. Dose letal (DL_{50}) de *A. hydrophila* para o tambaqui

Durante o experimento (período de 96 horas) com *A. hydrophila* foi quantificada a mortalidade cumulativa (Tabela 2). Observou-se que os peixes do tratamento controle apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto que a taxa de mortalidade foi proporcional em

relação à concentração bacteriana, sendo que a maior taxa de mortalidade ocorreu nos peixes dos tratamentos com as maiores concentrações da bactéria 48 horas após inoculação. As primeiras mortalidades ocorreram após 24 horas da inoculação bacteriana. A partir das 12 horas da inoculação até a mortalidade dos juvenis de tambaqui, foram observados, em todos os tratamentos, com exceção do tratamento controle, sinais clínicos de infecção nos peixes, tais como: apatia, hemorragia ao longo do corpo, natação errática, exoftalmia, perda de equilíbrio e aumento na secreção de muco (Figuras 1).

De acordo com os dados obtidos, a dose letal de *A. hydrophila* para a mortalidade de 50% da população de juvenis de tambaqui com peso médio de 61 g em 96 horas foi 2,736 x 10^{11} UFC.mL^{-1}.

4. DISCUSSÃO

4.1. Qualidade da água

Para aumentar a margem de confiabilidade nos testes nos experimentos de laboratório, a qualidade da água deve ser monitorada e apresentar padrão de qualidade compatível com as exigências dos organismos, pois a alteração em pelo menos uma das variáveis físicas e químicas pode interferir nos resultados (Ranzani-Paiva *et al*., 2004; Affonso *et al*., 2007; Andrade *et al*., 2007; Oliveira *et al*., 2011). Isso deve ser ainda mais criterioso quando são realizados experiementos para determinar os níveis de tolerância de uma espécie sobre um agente estressor, pois deve-se assegurar que os resultados obtidos sejam uma consequência deste estressor testado (Cavero *et al.*, 2004; Lima, 2003; Oliveira *et al*., 2011).

Os valores obtidos para oxigênio dissolvido, temperatura, pH, condutividade eletricidade e gás carbônico, durante todo o experimento e encontram-se dentro do intervalo aceitável para a piscicultura (Arana, 1997; Kubitza, 2003). Estes resultados são ainda

corroborados pelos estudos realizados por Saint-Paul (1984) e Almeida-Val *et al*. (1993) para oxigênio dissolvido e por Aride *et al*. (2007) para pH toleráveis pelo tambaqui.

A alcalinidade apresentou valores médios entre 1,9 ± 0,2 e 2,8 ± 0,6 mg $CaCO_3$/L e a dureza entre 1,3 ± 0,2 e 1,5 ± 0,13 mg $CaCO_3$/L. Segundo Kubitza (2003), baixos valores de alcalinidade e dureza (< 30 mg de $CaCO_3$/L) não funcionam como um bom sistema tampão, entretanto, em tanques onde a atividade fotossintética é mínima ou inexistente, a ausência do sistema tampão não causa prejuízo aos peixes, não interferindo nesse experimento.

Segundo Boyd (1992), a concentração de amônia total na água do cultivo não deve ultrapassar 1 $mg.L^{-1}$, pois pode prejudicar consideravelmente o crescimento dos peixes. A quantidade de amônia ionizada (NH_4^+) e não-ionizada (NH_3) no ambiente depende principalmente do pH e da temperatura da água (Kubtiza, 2003; Ono e Kubtiza, 2003) Os valores das concentrações de amônia total e tóxica aumentaram proporcionalmente com as concentrações da bactéria na água (Tabela 1), entretanto permaneceram abaixo dos limites máximos tolerados pelo tambaqui, pois, segundo Marcon *et al*. (2004), a 96h DL_{50} estimada para amônia não ionizável foi 0,69 mgNH_3/L (limites de confiança de 0,64-0,73). Portanto, a amônia não deve ter influenciado os resultados obtidos para tambaqui no presente estudo.

Durante os experimentos, foi observada a liberação de muco pelos peixes infectados com as altas concentrações bacterianas, e, consequentemente, com as altas concentrações de amônia na água. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por Oliveira *et al*. (2011), para matrinxã infectada com *A. hydrophila*, que associa os altos valores de amônia com a decomposição do muco por processos microbiológicos.

O nitrito (NO_2^-) é outro parâmetro importante na avaliação da qualidade da água. Este é um metabólito intermediário do processo de nitrificação, no qual a amônia é oxidada à nitrato (NO_3^-) através da ação de bactérias. Condições de baixo oxigênio dissolvido prejudicam o desempenho da bactéria do gênero *Nitrobacter*, favorecendo o acúmulo de

nitrito na água (Kubitza, 2003). Altas concentrações de nitrito (0,3 a 0,5 mg/L) podem causar redução no crescimento e na resistência dos peixes à doenças (Kubitza, 2003). Costa *et al.* (2004) encontraram valor de DL_{50} de 1,82 mg NO_2^- mg/L para o tambaqui, demonstrando elevada sensibilidade desta espécie ao nitrito. Os autores citam, ainda, que a bioacumulação do nitrito no tambaqui induz a meta-hemoglobinemia e anemia hemolítica prejudicando os processos vitais e acelerando os gastos energéticos dos peixes.

4.2. Dose letal (DL_{50}) de *A. hydrophila* para tambaqui

O aparecimento de patógenos nos sistemas intensivos de criação está diretamente relacionado às condições de estresse a que os peixes estão expostos. Consequentemente, inúmeras doenças ocorrem, principalmente por parasitos, fungos, vírus e bactérias (Carvalho-Castro *et al.*, 2010). Dentre estas, destacam-se as bactérias oportunistas, como a *A. hydrophila*, as quais podem, em casos de estresse, levar os peixes à morte (Sharma *et al*., 2000; Costa e Cyrino, 2006). Vários são os sinais clínicos que podem ser observados em peixes infectados com *A. hydrophila*, entre eles: perda de apetite, apatia, perda de equilíbrio, hemorragias ao longo do corpo, lesões epidérmicas como despigmentação, necrose da pele, úlceras com exposição da musculatura e alterações no comportamento. Internamente, os órgãos podem estar friáveis e esbranquiçados, com necroses do tecido hematopoiético dos rins e baço, cavidade peritoneal com exsudato, intestino flácido com muco amarelo e sem alimento (Roberts, 1993; Aoki, 1999). Boijink e Brandão (2001) em experimento com jundiá, *Rhamdia quelen*, inoculados por injeção intramuscular com bactéria *A. hydrophila*, observaram comportamento alterado, com perda de equilíbrio e movimentos respiratórios lentos.

Bactérias do gênero *Aeromonas* podem atacar as brânquias, o tegumento e o intestino de peixes. Segundo Pavanelli (2010), tais bactérias são capazes de provocar a ruptura de

pequenos vasos sanguíneos, implicando em lesões ulcerativas no tegumento, com aspecto hemorrágico, causando uma coloração avermelhada no corpo dos peixes. No presente estudo, além das lesões ulcerativas distribuídas pelo corpo dos tambaquis, foram observadas também apatia, perda de equilíbrio, natação errática, erosão nas nadadeiras, exoftalmia a e presença excessiva de muco na região da cabeça (Figura 1). Essas observações são corroborados com os estudos de Andrade *et al*. (2006) e Oliveira *et al.* (2011) para matrinxã, *B. amazonicus*, infectada por *A. hydrophila.*

O efeito da bactéria *A. hydrophila* sobre os peixes pode variar de acordo com a resistência dos mesmos à infecção (Schlotfeldt e Alderman, 1995). Santos *et al*. (1991) determinaram a 96-h DL_{50} da *A. hydrophila* para várias espécies de peixes: *Salmo trutta* ($2,0x10^5$ células.mL^{-1}), *Anguilla japonica* (>10^8 células.mL^{-1}), *Plecoglossus altivelis* ($8,6x10^4$ células.mL^{-1}), *Lepomis macrochirus* (>10^8 células.mL^{-1}). Brasil *et al.* (2008) encontraram 96-h DL_{50} de *A. hydrophila* para juvenis de tambaqui com peso médio de 20 g de $1,0x10^{10}$ UFC.mL^{-1}. Oliveira *et al.* (2011) encontraram valor de 96-h DL_{50} para *A. hydrophila* de $6,6x10^{11}$ UFC.mL^{-1} para juvenis de matrinxã, *B. amazonicus*, com peso médio de 60 g, enquanto que Andrade *et al.* (2007) encontraram 96-h DL_{50} de $4,6x10^{11}$ UFC.mL^{-1} para a mesma espécie com peso médio de 55 g quando inoculadas intramuscularmente.

Comparando os resultados obtidos neste estudo com os valores letais decritos para outras espécies de peixes, pode-se afirmar que o tambaqui apresenta alta tolerância (96-h DL_{50} = $2,4x10^{11}$ UFC.mL^{-1}) a bactéria *A. hydrophila*. Os resultados obtidos neste estudo são importantes para subsidiar novos estudos nos quais sejam necessários testes de desafios ou práticas de manejo para esta espécie.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Fisiologia de Peixes Aplicado a Piscicultura e ao Laboratório de Microbiologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), à FAPEAM e à CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affonso, E.G.; Silva, E.C.; Tavares-Dias, M.; Menezes, G.C.; Carvalho, C.S.M.; Nunes, E.S.S.; Ituassú, D.R.; Roubach, R; Ono, E.A.;. Fim, J.D.I.; Marcon. J.L. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses R.R of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comparative Biochemystri Physiology*. A. 147: 383-385.

Almeida-Val, V.M.F.; Farias, F.P.; Duncan, W.P.; Val, A.L. 1995. Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon ciclids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* 28: 1257-1263.

Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Brasil, E.; Matsura T.; Affonso, E.G. 2006. Influência da vitamina C na dieta da matrinxã, (Brycon amazonicus) após infecção por Aeromonas hydrophila. In: *Anais da X Jornada de Iniciação Científica*, PIBIC/INPA, Manaus.

Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Menezes, G.C.; Brasil, E.M.; Roubach, R.; Urbinati, E.C.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comparative Biochemistry Physiology A*, 146: 576-580.

Aoki, T. 1999. Motile aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In. Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (Ed) *Fish diseases and disorders. Viral, bacterial and fungal infections*. Oxon: CABI Publishing. 427-453p.

Arana, L.V. 1997. *Princípios químicos e físicos de qualidade da água em piscicultura: uma revisão para peixes e camarões.* (Ed) UFSC. Florianópolis. Santa Catarina. 166p.

Aride, P.H.R.; Roubach, R.; Val, A.L. 2007. Tolerance response of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquaculture Research*. 38:588-594.

Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative Comparative Biology*. 42: 517-525.

Biller, J.D. 2008. *Respostas fisio-patológicas e desafio por Aeromonas hydrophila em pacu alimentado com ração suplementada com β 1,3 glicano.* Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo. 114p.

Boijink, C.L.; Brandão, D.A. 2001. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamidia quelen*, (Teleostei: Pimelodidae). *Ciência Rural*, 3(3): 503-507.

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

Boyd, C.E.; Tucker, C.S. 1992. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn: Auburn University. 183p.

Brasil, E.M.; Ono, E.A.; Andrade, J.I.A.; Fernandes, E.B.; Maciel, P.O.; Perez, C.A.C.; Sobreira, C.I.B.; Souza, R.Y.T.B.; Oliveira, S.R.; Affonso, E.G. 2008. Deterninação da dose letal (DL_{50}) de *Aeromonas hydrophila* para tambaqui, *Colossoma macropomum*. In: Encontro Brasileiro de Patologista de Organismo Aquáticos, X ENBRAPOA, Búzios, 2008.

Carvalho-Castro, G.A.; Lopes, C.O.; Leal, C.A.G.; Cardoso, P.G.; Leite, R.C.; Figueiredo, H.C.P. 2010. Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 144:371-376.

Cavero, B.A.S.; Pereira-Filho, M.; Bordinhon, A.M.; Fonseca, F.A.L.; Ituassú, D.R.; Roubach, R.; Ono, E.A. 2004. Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira,* 39(5): 513-516.

Chakrabarti, R.; Rao, Y.V. 2006. *Achyranthes aspera* stimulates the immunity and enhances the antigen clearance in *Catla catla*. *International Immunopharmacology*, 6: 782-790.

Costa, A. B; Cyrino, J.C.P. 2006. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated fron *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Scientia Agricola*, 63: 281-284.

Costa, A.B. 2004. Estratégias para o estudo de bactérias potencialmente patogênicas na piscicultura. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds). *Tópicos especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical intensiva*. Editor TechArt. São Paulo. 532p.

Costa, O.T.F.; Ferreira, D.J.S.; Mendonça, F.P.; Fernandes, M.N. 2004. Susceptibility of Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasaminae) to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, 232: 627-636.

Findllay, V.L.; Munday, B.L. 2002. The immunomodulatory effects of levamisole on the non-specific immune system of Atlantic salmon, *Salmon salar L*. *Journal of fish Diseases*, 23: 369-378.

Gomes, L.C.; Brandão, F.R.; Chagas, E.C.; Ferreira, M.F.B.; Lourenço, J.N.P. 2004. Efeito do volume do tanque-rede na produtividade do tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante a recria. *Acta Amazonica*, 34: 111-113.

Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, R.V. 1977. Trimmed spearman-karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology*, 12(4): 417.

Kodama, H.; Denso, A.; Nakagawa, T. 2007. Protection against atypical *Aeromonas salmonicida* infection in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of humus extract. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(4): 405-408.

Kubtiza, F. 2003. *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões.* Jundiaí. 229p.

Lima, R.L. 2003. *Inclusão do sal na ração e a toxicidade do nitrito em alevinos de jundiá (Rhamdia quelen).* Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. 60p.

Marcon, J.L.; Moreira, S.S.; Fim, J.D.I. 2004. Median lethal concentration (LC_{50}) for un-ionized ammonia in two Amazonian fish species, *Colossoma macropomum* and *Astronotus ocellatus*. In: VI International Congress on the Biology of Fish. Manaus. 1:105-116.

Moraes, F.R; Martins, M.L. 2004. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds). *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce* Tropical Intensiva. Editora TechArt. São Paulo. 532p.

Oliveira, S.R. 2008. *Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse de transporte do matrinxã, Brycon amazonicus*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas.

Oliveira, S.R.; Souza, R.T.Y.B.; Brasil, E.M.; Andrade, J.I., Nunes, E.S., Ono, E.A., Affonso, E.G. 2011.LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus. Acta Amazônica,* 41(2): 321-326.

Ono, E.A; Kubitza, F. 2003. *Cultivo de peixes em tanques-rede*. 3 ed. Ono, E.A, Jundiaí, São Paulo, 170p.

Ono, E.A. 2005. Cultivar Peixes na Amazônia: Possibilidade ou Utopia? *Panorama da Aqüicultura*, 15: 41- 48.

Ono, E.A.; Roubach, R.; Lourenço, J.N.P. 2003. Socio-economic and environmental considerations for the development of cage fish culture in the central Amazon, Brazil. In: Aquaculture Europe 2003 Beyond Monoculture Aquanor, 2003, Trondheim. Beyond monoculture Aquaculture International - EAS Special Publication no. 33. Ostende, Belgium: European Aquaculture Society. 33: 280-281.

Pavanelli, G.C.; Eiras, J.C.; Takemoto, R.M. 2010. *Doenças de peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento*.3ª Ed. Eduem, Maringá. 305p.

Rao, Y.V.; Chakrabarti, R. 2005. Stimulation of immunity in Indian major carp *Catla catla* with herbal feed ingredients. *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 327-334.

Razani-Paiva, M.J.T.; Ishikawa, C.M.; Eiras, A.C.; Silveira, V.R. 2004. Effects of experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilápia, *Oreochromis noloticus* (Linnaeus, 1757). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46: 945-953.

Roberts, R.J. 1993. Motile Aeromonad Septicaemia. In. Inglis, V., Roberts, R.J., Bromage, N.R. (Ed) *Bacterial diseases of fish*. Oxford. Blackwell Science. cap8. 143-155p.

Roberts, T.A.; Baird-Parker, A.C.; Tompkim, R.B. 1996. Aeromonas. In: *Microorganisms in foods. Characteristics of Microbial Pathogens.* Blakie Academic and Professional, London. 5-9p.

Sahoo, P.K.; Mukherjee, S.C. 2003. Immunomodulation by dietary vitamin C in healthy and aflatoxin B1- induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infeccions Disease*, 26: 65-76.

Sahu, S.K.; Gummadi, S.N.; Manoj, N.; Aradhyam, G.K. 2007 Phospholipid scramblases: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462: 103–314.

Saint-Paul, U. 1986. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes; a review. *Aquaculture Amsterdam*. 54: 205-240.

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172: 63-92.

Santos, Y.; Bandín, I.; Nieto, T.P. 1991. Cell-surface-associated properties of fish pathogenic bacteria. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3:297-301.

Sharma, A.; Marsh, C.M.; Dorman, M.F. 2000. Relationship between N1 evoked potential morphology and the perception of voicing. *Journal of the Acoustical Society of America*, 108(6): 3030-3335.

Zacarias, C.H.; Santos, P.E. 2009. A importância da FISPQ no processo de gerenciamento de risco químico – uma visão crítica e conceitual. *Revinter-Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, 2(2): 29-42.

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas da água durante 96 horas de experimento para determinação da DL_{50} de *Aeromonas hydrophila* em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum.* TR1 = solução salina 0,85%; TR2 = 2,736x10^{10} UFC.mL^{-1}; TR3 = 2,736x10^{11} UFC.mL^{-1}; TR4 = 2,736x10^{12} UFC.mL^{-1}. Valores expressos em média ± desvio padrão.

Variáveis da água	Tratamentos			
	TR1	**TR2**	**TR3**	**TR4**
Oxigênio Dissolvido (mg.L^{-1})	7,6 ± 0,08 a	7,7 ± 0,12 a	7,6 ± 0,15 a	7,6 ± 0,09 a
Temperatura (°C)	24,4 ± 0,09 a	24,4 ± 0,17 a	24,4 ± 0,15 a	24,5 ± 0,08 a
pH	7,3 ± 0,17 a	7,3 ± 0,07 a	7,3 ± 0,09 a	7,3 ± 0,13 a
Condutividade (µS.$cm^{3\ -1}$)	21,6 ± 0,3 a	28,9 ± 8,8 a	28,9 ± 8,8 a	32,7 ± 1,9 a
Amônia Total (mg.L^{-1})	1,12 ± 0,09 a	1,31 ± 0,14 a	1,45 ± 0,18 a	2,19 ± 0,02 b
Amônia Tóxica (mg.L^{-1})	0,005 ± 0,0001 a	0,006 ± 0,0001 a	0,007 ± 0,0001 a	0,011 ± 0,001 b
Nitrito (mg.L^{-1})	0,01 ± 0,0001a	0,01 ± 0,0001 a	0,01 ± 0,0001 a	0,02 ± 0,0001 b
CO_2 (mg.L^{-1})	8,9 ± 0,1 a	9,2 ± 1,0 a	9,5 ± 0,9 a	9,2 ± 0,4 a
Dureza (mg $CaCO_3$.L^{-1})	1,5 ± 0,13 a	1,4 ± 0,26 a	1,3 ± 0,28 a	1,5 ± 0,07 a
Alcalinidade (mg $CaCO_3$.L^{-1})	1,9 ± 0,22 a	2,0 ± 0,17 a	2,1 ± 0,24 a	2,8± 0,63 a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 2. Mortalidade de tambaqui, *Colossoma macropomum*, após 96 h de inoculação peritoneal de diferentes concentrações de *Aeromonas hydrophila*. TR1 = solução salina 0,85%; TR2 = 2,736 x10^{10} UFC.mL^{-1}; TR3 = 2,736x10^{11} UFC.mL^{-1}; TR4 = 2,736 x10^{12} UFC.mL^{-1}.

Tratamentos	Mortalidade	
	Quantidade de peixes mortos	**Peixes mortos (%)**
TR1	0	0,0
TR2	3	16,6
TR3	9	50,0
TR4	18	100,0

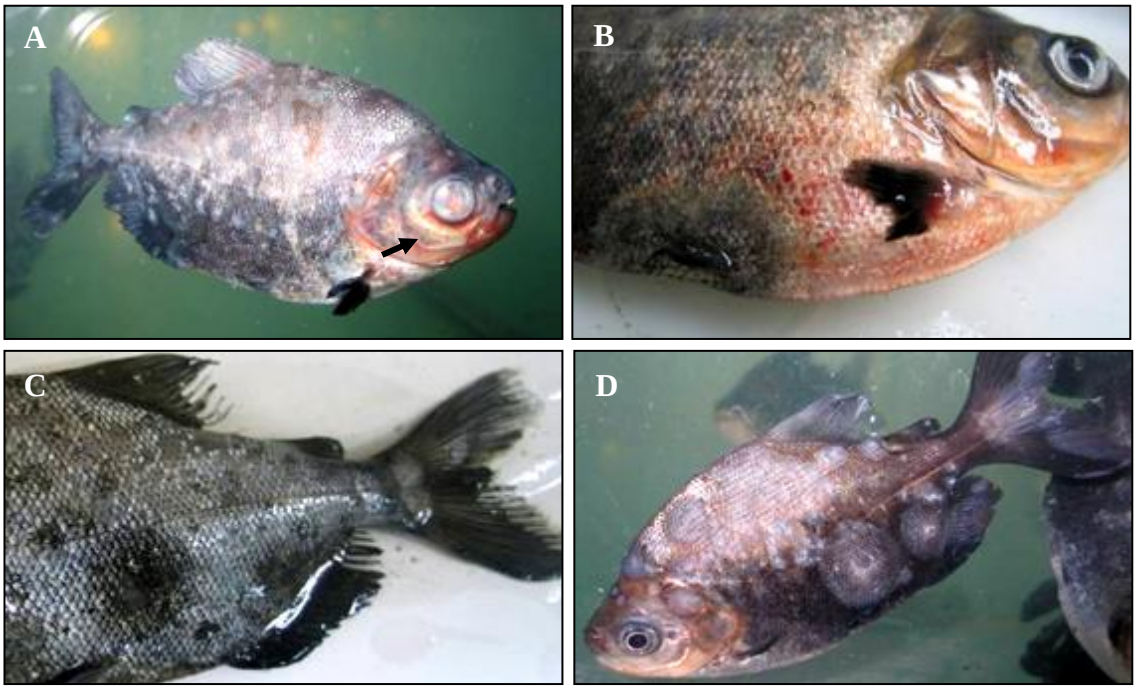

Figura 1. Sinais clínicos observados no tambaqui, *Colossoma macropomum*, infectado com a bactéria *Aeromonas hydrophila*: perdas de escamas e exoftalmia (A), hemorragia (B), erosão nas nadadeiras (C) e lesões na pele (D).

CAPÍTULO 2

Respostas fisiológicas de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com levamisol e glicano, após desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*

Normas de acordo com a Revista da Acta Amazonica

Respostas fisiológicas de tambaqui, *Colossoma macropomum***, alimentados com dietas suplementadas com levamisol e glicano, após desafio com a bactéria** *Aeromonas hydrophila*

Ana Maria Dias da SILVA e-mail: anadias17@hotmail.com

Marcio Quara de Carvalho SANTOS e-mail: marcioquara@hotmail.com

Elenice Martins BRASIL e-mail: nice@hotmail.com

Jaqueline Inês Alves de ANDRADE e-mail: jaque_bio@hotmail.com

Elizabeth Gusmão AFFONSO e-mail: pgusmao@inpa.gov.br

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Av. André Araújo, 2936, Aleixo. Caixa Postal: 478. CEP: 69060-0001 – Manaus, Amazonas, Brasil

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de diferentes concentrações de glicano (0, 1, 5 e 10 $mg.kg^{-1}$) e levamisol (0, 100, 250, 500 $mg.kg^{-1}$) na dieta de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, sobre o desempenho produtivo e as respostas fisiológicas após 60 dias de alimentação e após submissão ao teste de desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*, após 7 e 15 dias da infecção. Os resultados de desempenho zootécnico, parâmetros fisiológicos e sobrevivência dos juvenis de tambaqui, após a realização do desafio bacteriano, com excessão do número de trombócitos, não foram influenciados pela suplementação de levamisol e glicano na dieta. Os resultados obtidos sugerem que a suplementação de levamisol e glicano na dieta do tambaqui não proporcionou uma melhoria no desempenho zootécnico e no perfil fisiológico dos juvenis de tambaqui após 60 dias. Além disso, estes imunoestimulantes não foram capazes de minimizar as respostas de estresse causadas pela infecção por *A. hydrophila*.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, imunoestimulante, levamisol, glicano, tambaqui.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of levamisole (100, 250, 500 $mg.kg^{-1}$) and glucan (0, 1, 5 e 10 $mg.kg^{-1}$) added to the diet of juvenile tambaqui on the growth, and blood, physiological and immunological parameters after bacteria *Aeromonas hydrophila* challenge. Fish were fed during 60 days to evaluate growth. After fish were challenged to *A. hydrophila*. Blood, physiological and immunological parameters were measured before and after exposure to bacteria. Water quality parameters were also monitored. It was observed no differences on tambaqui growth and survival during the rearing period. Levamisole and glucan on tambaqui diet did not improve growth and physiologic profile after 60 days. Besides these two products could not enable fish organic functions when challenged to *A hydrophila.*

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, immunostimulant, levamisole, glucan, tambaqui

1. INTRODUÇÃO

Com a intensificação da piscicultura, nos últimos dez anos, a sanidade dos peixes tem sido uma das grandes preocupações do setor aquícola, pois estes são frequentemente expostos a vários agentes estressores potenciais, tais como o transporte, a captura, o manejo inadequado, a má qualidade da água, as altas densidades de estocagem, distúrbios nutricionais, entre outros (Martins *et al*., 2000; Pavanelli, 2010).

Uma alternativa profilática que tem sido utilizada em tais situações é a adição de substâncias imunoestimulantes na dieta dos peixes. Estas substâncias podem minimizar os efeitos negativos do estresse em sistemas de criação intensiva, devido ao aumento da resistência imunológica dos peixes (Menezes *et al*., 2006; Affonso *et al*., 2007; Andrade *et al*., 2007; Oliveira, 2008; Abreu *et al.*, 2009; Chagas, 2010; Oliveira *et al*., 2011). Dois imunoestimulantes que têm demonstrado resultados satisfatórios como profiláticos, devido à ausência de efeitos negativos na qualidade da água, além de excelente alternativa no controle de infecções bacterianas comuns no processo de produção, são o levamisol e o glicano (Anderson e Jeney, 1992; Abreu, 2007).

O levamisol, um finimidazoltiazole sintético, além do seu efeito imunoestimulante, tem sido amplamente utilizado como agente anti-helmíntico em seres humanos e na medicina veterinária. Em peixes, essa substância tem sido estudada e testada como agente não específico, atuando na resposta imune ou de forma complementar em vacinas (Anderson e Jeney, 1992; Sado, 2008). O levamisol atua em adaptações das funções das células T (Renoux, 1980), na atividade citotóxica dos leucócitos (Cuesta *et al.*, 2002) e respiratória (Siwicki, 1989; Mulero *et al.*, 1998; Findlay e Munday, 2002), na fagocitose e na ativação do fator de macrófagos (Mulero *et al*., 1998). Siwicki (1989) registrou aumento no número de leucócitos e capacidade fagocítica de neutrófilos, assim como nos níveis de lisozimas, após administração oral de levamisol em carpas, *Cyprinus carpio*. Kajita *et al*. (1990) verificaram

uma melhora na resposta imune não específica após injeção de levamisol em truta arco-íris, *Oncohynchus mikyss*, em testes de desafio com cepas virulentas de *Vibrio angullarum*. Sado (2008) observou eficácia do levamisol em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, com dietas suplementadas com 100 mg de levamisol por um período de 15 dias. Contudo, apesar dos estudos que evidenciam a eficácia dessa substância, é necessário conhecimentos sobre a utilização desses compostos químicos, pois altas doses podem causar um quadro de imunossupressão, enquanto que subdosagens podem não ser eficientes (Anderson *et al*., 1989; Siwicki *et al.,* 1990; Mulero *et al*., 1998; Kumari *et al.,* 2003; Li *et al*., 2004).

Além do levamisol, os glicanos têm mostrado efeitos positivos na imunidade dos peixes (Robertsen, 1999; Sakai, 1999; Konzinska e Guz, 2004; Selvaraj *et al*., 2004; 2005; Dautremepuits *et al*., 2006; Abreu, 2007; Ai *et al*, 2007; Oliveira, 2008; Schorer, 2008; Chagas, 2010). Esse imunoestimulante, quando suplementado na dieta antes e durante o estresse, pode aumentar, potencialmente, as taxas de resistência e sobrevivência dos peixes às doenças após o transporte ou a exposição à baixa qualidade de água (Jeney *et al*., 1997; Palic *et al.*, 2006). Injeções intraperitoniais com glicano em peixes demonstraram respostas imunes na atividade dos macrófagos (Jeney e Anderson, 1993; Jorgensen *et al.*, 1993), ativação complementar e nível de lisozima (Engastad *et al.*, 1992; Abreu, 2007; Abreu *et al.*, 2009). Quando administrados oralmente, os glicanos são capazes de estimular as respostas imunes e a resistência a doenças em peixes (Raa *et al*., 1992; Siwicki et al., 1994).

Um dos métodos de avaliação da eficácia dos imunoestimulantes, sob condições experimentais em laboratório, é o teste de desafio contra agentes estressores ou patogênicos (Choudhury *et al*., 2005; Andrade *et al*., 2006; Selvaraj *et al*., 2006). A bactéria Gram-negativa *Aeromonas hydrophila* foi utilizada em testes de desafio como agente estressor para juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*, nos estudos sobre a eficácia de levamisol como mitigador de estresse do transporte (Oliveira, 2008; Oliveira *et al*., 2011). Estas bactérias são

tipicamente oportunistas, patogênicas facultativas e manifestam-se em hospedeiros enfraquecidos e atacados por outros agentes etiológicos (Ventura e Grizzle, 1998; Oliveira, 2008).

Um dos indicadores comumente utilizados na avaliação do estado de saúde dos peixes é a hematologia (Iwama *et al*., 1976; Ranzani-Paiva *et al*., 2004; Tavares-Dias e Moraes, 2004; Tavares-Dias e Moraes, 2010). As análises hematológicas são importantes ferramentas para a identificação de situações de estresse causadas pelo ambiente de cultivo, dentre eles os patógenos (Tavares-dias e Moraes, 2004; Pavanelli *et al*., 2010; Tavares-Dias *et al*., 2009). Recentemente foram determinados valores de referências para os parâmetros hematológicos de espécies nativas de cultivo, como o tambaqui (*Colossoma macropo*mum), matrinxã (*B. amazonicus*), pirarucu (*Arapaima gigas*), entre outros (Tavares-Dias *et al*., 2009; Tavares-Dias e Moraes, 2010). O estabelecimento desses valores de referências para as variáveis hematológicas dessas espécies cultivadas é importante para o diagnóstico de doenças (Tavares-Dias *et al*., 2009; Tavares-Dias e Moraes, 2010).

Na piscicultura brasileira, o tambaqui é a espécie nativa mais cultivada, com uma produção de 46.450 toneladas no ano de 2009 e a segunda com maior percentagem de crescimento (Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA, 2010). No estado do Amazonas, sua produção foi cerca de 9.000 toneladas em 2009, o que significa 82% da produção total de pescado produzido em cativeiro (Secretaria Executiva de Pesca e Aquicultura – SEPA/SEPROR, 2010; Gandra, 2010). Isso se deve, principalmente, ao seu potencial para criação intensiva, oferta de juvenis, fácil crescimento, alta produtividade, resistência a baixos níveis de oxigênio, boa conversão alimentar e grande mercado consumidor (Melo *et al*., 2001; Araújo-Lima e Gomes, 2005; Chagas, 2010).

Apesar de sua cadeia produtiva praticamente completa, a espécie ainda necessita de informações que possam contribuir com uma melhor produtividade e, consequentemente,

menor custo de produção. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de levamisol e glicano nas respostas fisiológicas dos juvenis de tambaqui, após infecção causada pela bactéria Gram-negativa *A. hydrophila*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e aclimatação dos peixes

Os peixes foram obtidos na Piscicultura Santo Antônio, localizada na rodovia AM 010, Km 112, município de Rio Preto da Eva, AM e transferidos para a Estação Experimental de Piscicultura da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura – CPAQ do INPA. Os peixes foram mantidos em tanques de PVC com capacidade para 500 L e alimentados com ração extrusada contendo 36% de proteína bruta (PB) até atingirem o peso ideal para o experimento.

2.2. Dietas experimentais

A suplementação do glicano e levamisol foi feita em ração comercial contendo 36% PB. As concentrações de levamisol (L) testadas neste estudo foram: 100, 250 e 500 mg de levamisol.kg^{-1} de dieta. Cada uma dessas concentrações foram dissolvidas em 350 mL de água, misturadas manualmente e, em seguida, submetidas ao processo de secagem em estufa à 55ºC, por 24 horas, e armazenadas em potes plásticos até sua utilização. Para a suplementação de glicano (G), foram utilizadas as concentrações de 1, 5 e 10 mg de glicano.kg^{-1} de dieta e preparadas com o mesmos procedimento descrito acima. Para o tratamento controle, utilizou-se a mesma ração comercial e o mesmo processo de preparação descrito acima, mas sem a suplementação de levamisol e glicano.

2.3. Desenho experimental

Após o período de aclimatação, os peixes foram submetidos a uma biometria e selecionados de acordo com o peso e comprimento (peso = 14,8 ± 4,3 g e comprimento = 6,7 ± 2,5 cm). Em seguida, os peixes foram agrupados em 21 grupos, com 20 exemplares cada, e distribuídos em tanques de PVC, com capacidade para 500 L, fluxo de água e aeração constantes. Após o início do experimento, os tanques foram sinfonados a cada três dias, para retirada de resíduos (ração e fezes).

O desenho experimental consistiu de sete tratamentos: Controle – somente ração comercial com 36% PB; L100, L250 e L500 com suplementação de 100, 250 e 500 mg de levamisol.kg^{-1} de dieta respectivamente; G1; G5 e G10 com suplementação de 1, 5 e 10 mg de glicano.kg^{-1} na dieta respectivamente. Cada tratamento foi constituído por três réplicas e a alimentação realizada duas vezes ao dia (9:00 e 15:00 h) até a saciedade aparente, durante 60 dias. Após este período, foi feita uma biometria de todos os peixes e coletada amostras de sangue de seis peixes de cada réplica, utilizadas para as análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas (pré-desafio).

Para avaliar a eficácia das diferentes concentrações de levamisol e glicano, doze peixes, de cada tratamento, foram submetidos ao teste de desafio com soluções de bactéria *A. hydrophila* inoculada dentro da cavidade celomática numa concentração de 1,44 x 10^{11} UFC da bactéria, a partir de 60% da DL_{50}, determinada previamente no experimento descrito no Capítulo II.

Após 7 e 15 dias da inoculação, amostras de sangue de 6 animais de cada tratamento foram coletadas para análise dos parâmetros fisiológicos (pós-desafio) e avaliada a sobrevivência dos peixes.

2.4. Monitoramento da qualidade de água

Antes do início dos experimentos e durante todo o processo experimental, foram feitas análises físicas e químicas da água (temperatura, O_2, condutividade elétrica, pH, amônia, nitrito, dureza, CO_2 e alcalinidade) dos tanques experimentais.

As concentrações de oxigênio dissolvido e os valores da temperatura, condutividade elétrica e pH foram medidos diariamente às 9:00 horas, enquanto que as análises de amônia, nitrito, alcalinidade, dureza e CO_2 foram realizadas semanalmente. O oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica e pH foram determinados utilizando um medidor multiparamétrico digital da marca YSI (Yellow Spring Instrument). A concentração de amônia total ($NH_3 + NH_4^+$) foi determinada pelo método colorimétrico segundo Verdouw *et al*. (1978) e a concentração de nitrito (NO_2) pelo método colorimétrico de Boyd e Tucker (1992). A alcalinidade, dureza e CO_2 determinadas por meio de titulação segundo Boyd e Tucker (1992).

2.5. Coleta e análises de sangue

O sangue foi coletado por meio da punção caudal utilizando-se seringas contendo EDTA a 10% e destinado à determinação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos descritos a seguir.

2.5.1. Parâmetros Hematológicos

Após a coleta de sangue, foram feitas as determinações do hematócrito (Ht) pelo método do microhematócrito, o número de eritrócitos (RBC), utilizando a solução de Natt e Herrick (1952) e a dosagem de hemoglobina (Hb) pelo método da cianometahemoglobina. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram computados a partir dos valores brutos de Ht, [Hb] e RBC. A contagem dos

leucócitos totais (WBC) e trombócitos foi feita utilizando-se as extensões sanguíneas segundo Tavares-Dias *et al.* (2002), após serem previamente coradas pelo método de coloração rápida May Grünwald-Giemsa Wright (MGGW), segundo Tavares-Dias e Moraes (2003).

2.5.2. Parâmetros Bioquímicos

Após a centrifugação do sangue, o plasma foi utilizado para a determinação da glicose pelo método enzimático-colorimétrico utilizando kit comercial (Doles®). As concentrações dos íons Na^+, K^+ e Ca^{2+} foram determinadas utilizando-se um espectrofotômetro de absorção atômica da marca Perclin Elmer (AAS), modelo 1100B. O íon Cl^- foi determinado pelo método colorimétrico utilizando um kit comercial (Doles®). As amostras foram lidas em espectrofotômetro da marca Bioplus 2000, em absorbância de 540 nm.

O cortisol foi determinado pelo método de ELISA, utilizando o kit Enzyme Immunoassay Correlate-EIA Cortisol e lido em 450 nm, num espectofotômetro de placa (marca Spectramax plus 384). Os resultados foram calculados por meio de uma curva padrão em ng/µL.

2.5.3. Parâmetros Imunológicos

A concentração e a atividade de lisozimas foi analisado por ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990), modificado por Marzochi-Machado *et al.* (1999) e Abreu (2007). A curva padrão feita com lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha diluída em 50 mL de tampão fosfato de sódio (0,05M; pH=6,2) contendo 10 mg de *Micrococus lysodeikticus*, cujas diferentes concentrações foram lida em espectofotometro de placa Spectramaxplus 384 em 450 nm, e o resultado da diferença de DO (densidade ótica) inicial e final utilizada na quantificação das concentrações de lisozima nas amostras. As amostras de plasma foram inativadas (56ºC por 30 minutos) e diluídas com tampão fosfato de sódio, que, após incubação

por dois minutos à 26 °C, foram adicionadas da suspensão de *Micrococus lysodeikticus* e avaliada a concentração da densidade ótica (ΔDO) em 450 nm entre 0,5 e 10 minutos a 26 °C. A concentraçao da lisozima (μg mL-1) correspondeu a redução da ΔDO, enquanto que, a atividade da lisozima (U mL^{-1}) correspondeu a quantidade de enzima produzida, em ΔDO de 0,001 min^{-1} (Won *et al*., 2004).

2.6. Índices zootécnicos

A avaliação do desempenho dos juvenis de tambaqui foi realizada a partir das avaliações biométricas realizadas no início e no final do experimento. Com os dados biométricos, foram calculados:

Consumo Diário de Ração (CDR) = 100x[(quantidade de ração (g) /biomassa de peixe (g))/dias]; **Ganho de peso (GP)** = Pf – Pi. Onde: Gp = ganho de peso; Pf = peso médio final (g); Pi = peso médio inicial (g); **Conversão alimentar aparente (CAA)** = conversão alimentar aparente; RC = ração consumida (g); GP = ganho de peso (g); **Taxa de crescimento específico** (TCE) = 100* [(ln Pf – ln Pi)/t]. Onde: Pf = Peso final (g); Pi = Peso inicial; In: Logaritmo natural; t = dias de experimento; **Fator de Condição (FC**)= Pf/Cf^{3} x 100, onde Pf = peso final e Cf^{3} = cubo do comprimento final; **Coeficiente de Variação do Comprimento** (CV) = (desvio padrão do comprimento/comprimento médio) x 100; **Ao final do experimento foram avaliados os parâmetros de produtividade final:** sobrevivência (%), produção por área (peixes/m^2).

2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), na qual foram considerados os tempos de coletas (antes do desafio), 7 e 15 dias após o desafio e os tratamentos com diferentes concentrações de glicano e o tratamento controle; e diferentes

concentrações de levamisol e o tratamento controle. As variáveis que apresentaram efeitos significativos nos tratamentos foram submetidas ao teste de comparação de média de Tukey. Como pré-requisitos para a realização da análise de variância, foram avaliadas as premissas de normalidade e homogeneidade das variâncias. Ambas as análises foram realizadas ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Análise de água

Durante todo o período experimental, os parâmetros físicos e químicos da água, tais como: oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica, pH, alcalinidade, dureza e CO_2, não foram significativamente diferentes entre os tratamentos (Tabela 1) e períodos (7 e 15 dias após infecção bacteriana) (Tabelas 2 e 3), os quais mantiveram-se dentro dos níveis considerados desejáveis para a criação de peixes (Boyd, 1981; Arana, 1997; Kubitza, 2003).

3.2. Índices zootécnicos

Os resultados dos índices zootécnicos de tambaquis alimentados com dietas suplementadas com glicano e com levamisol e sem adição destes imunoestimulantes (controle) estão representados na Tabela 4.

A suplementação dos imunoestimulantes na dieta não influenciou no ganho de peso, no consumo aparente da dieta e na conversão alimentar aparente dos peixes após 60 dias de alimentação, comparados entre si e com o controle (Tabela 4).

Os valores mínimos e máximos de ganho de peso para os tratamentos com glicano e com levamisol foram 45,4 a 50,9 g e 47,7 a 50,9 g respectivamente, enquanto para aqueles do controle os valores variaram de 41,6 a 45,9 g (Tabela 4). A conversão alimentar aparente variou de 1,95 a 2,5 entre todos os tratamentos, sendo as conversões mais eficientes

observadas nos tratamentos L250 e G5 em relação aos demais (Tabela 4). O crescimento e o coeficiente de variação oscilaram entre os tratamentos, contudo, não apresentaram diferenças significativas. A taxa de sobrevivência foi de 100% em todos os tratamentos (Tabela 2).

3.3. Parâmetros hematológicos

Os resultados dos parâmetros sanguíneos analisados estão expressos nas Figuras de 1 a 5. O eritrograma dos peixes alimentados com dieta suplementada com glicano e levamisol não diferiu significativamente, ao final de 60 dias, em comparação aos peixes do tratamento controle. Os animais infectados com *A. hyprophila* também não apresentaram alterações significativas no eritrograma após 7 e 15 dias de infecção bacteriana e entre estes e os animais do controle (não-infectados) (Figura 1).

Os leucócitos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 2A). Por outro lado, o número de trombócitos foi significativamente inferior ($p= 0,009$) nos tratamentos G1 e G10, em comparação aos demais tratamentos (Figura 2B).

A concentração de cortisol plasmático não variou entre os tratamentos, entretanto, em todos os tratamentos foi observado um aumento significativo ($p= 0,001$) nos níveis de cortisol após 7 dias de inoculação bacteriana, seguido por uma redução ao final de 15 dias, porém, esses valores não retornaram aos níveis iniciais (Figura 3A).

O nível de glicose plasmática não variou significativamente entre os tratamentos, entretanto, foi observado uma redução significativa após 7 dias de inoculação bacteriana nos tratamentos L100 e L250, retornando aos valores iniciais após 15 dias (Figura 3B).

As concentrações iônicas de cloreto, sódio, cálcio e potássio não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, bem como ao longo do período experimental (Figura 4). A concentração e atividade de lisozima também não apresentaram

diferenças significativas entre os tratamentos assim como após 7 e 15 dias de inoculação bacteriana (Figura 5A e 5B).

Embora não tenha ocorrido nenhuma mortalidade dos juvenis de tambaqui após o desafio com *A. hydrophila*, foram observados sinais clínicos de infecção bacteriana, tais como: septicemia hemorrágica, hemorragia subcutânea e exoftalmia.

4. DISCUSSÃO

Em condições laboratoriais, fatores que podem interferir na qualidade do bioensaio devem ser constantemente monitorados (Ranzani-Paiva *et al.,* 2004; Oliveira *et al.,* 2011). Baixas concentrações de oxigênio dissolvido, altas concentrações de amônia, nitrito e dióxido de carbono, temperaturas desfavoráveis e pH muito ácidos ou muito alcalinos, são alguns exemplos de fatores abióticos que podem prejudicar a homeostase do animal, e, consequentemente, a precisão e confiabilidade dos resultados laboratoriais (Di Giulio e Hinton, 2008).

No presente estudo, as variáveis de qualidade de água monitoradas (O_2, temperatura, condutividade elétrica, alcalinidade, dureza, CO_2, pH, amônia e nitrito) nas unidades amostrais (tanques), de todos os tratamentos, permaneceram dentro dos padrões recomendados para a piscicultura de espécies tropicais (Arana, 1997; Kubtiza, 2003) e para o tambaqui (Val e Almeida-Val, 1995; Costa *et al.,* 2004; Aride *et al*., 2007), em função, provavelmente, do sistema de renovação constante da água.

Os estudos que avaliam o efeito da suplementação de imunoestimulantes na dieta de peixes são, em geral, realizados em períodos curtos e/ou em situações de estresse agudo, cuja eficiência é validada, principalmente, por meio de testes de desafio com bactérias ou pela indução de estresse causada por técnicas de manejo. Nessas pesquisas, as avaliações se

baseiam, sobretudo, nas respostas imunológicas dos animais, sendo o desempenho produtivo de pouca relevância (Cook *et al*., 2003; Whittington *et al*., 2005; Falcon, 2007).

Vários autores observaram que a suplementação de diferentes doses de imunoestimulantes na ração melhorou o desempenho produtivo e as respostas imunológicas em várias espécies de peixes (Mulero *et al.*, 1998; Leano *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Misra *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2006; Affonso *et al.*, 2007; Andrade et *al.*, 2007; Sado, 2008). Entretanto, neste estudo, a suplementação dos imunoestimulantes levamisol e glicano na dieta de tambaquis, alimentados por 60 dias, não induziu uma melhora no desempenho zootécnico dos peixes comparados com aqueles do controle, mas é possível verificar uma tendência na melhoria do ganho de peso dos peixes alimentados com os imunoestimulantes, principalmente nos tratamentos com 250 mg levamisol.kg^{-1} e 5 mg glicano.kg^{-1}. Esses resultados demonstram, ainda, que as concentrações utilizadas não produziram efeitos negativos que comprometessem a eficiência alimentar e a sobreviviência dos peixes. Segundo Li *et al*. (2004), a adição excessiva de imunoestimulantes pode desencadear efeitos negativos à homeostase dos animais, causando imunossupressão e redução da eficiência alimentar, ocasinando, consequentemente, uma depressão do crescimento.

A ausência da influência dos imunoestimulantes sobre o desempenho zootécnico dos peixes também foram observados por Sado (2008) para juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, alimentados até 45 dias com doses de 50 a 800 mg de levamisol.kg^{-1} de ração; Oliveira (2008), para juvenis de matrinxã, *B. amazonicus*, alimentados com 100 a 500 mg levamisol.kg^{-1} de ração por 45 dias e por Chagas (2010) para juvenis de tambaqui, alimentados com 0,1 a 0,8% de glicano.kg^{-1} na dieta, por 60 dias. Ao contrário, Mulero *et al.* (1998) observaram ganho de peso e de crescimento significativos em dourada, *Sparus aurata*, alimentados com dietas suplementadas com 125 mg de levamisol.kg^{-1} na ração, por 10 semanas, assim como Li *et al.* (2006) que observaram uma melhora de 10% no crescimento e

na conversão alimentar do robalo híbrido (*Morone chysops* x *Morone saxatilis*) alimentado com doses inferiores a 500 mg de levamisol.kg^{-1} de ração, por um período de três semanas.

Os diferentes resultados dos estudos sobre o efeito dos imunoestimulantes no desempenho zootécnico dos peixes podem ser justificados pelos diferentes métodos e tempos de administração destas substâncias, idade e estado fisiológico dos peixes e até mesmo em função das variações interespecíficas (Mulero *et al.,* 1998). Nesse sentido, é de extrema importância a determinação da dose ideal, bem como, do tempo de suplementação dos imunoestimulantes para cada espécie, visando assegurar a eficácia destas substâncias contra os agentes patogênicos ou estressores.

Além dos parâmetros zootécnicos, as análises hematológicas têm sido amplamente empregadas como índice de estresse ambiental em peixes (Heath, 1995; Tavares- Dias e Moraes, 2004; Vázquez e Guerrero, 2007). A hemoconcentração pode ser uma estratégia para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio do sangue sob situações de alta demanda energética (Heath, 1995; Montero *et al*., 1999; Carvalho e Fernandes, 2006; Trenzado *et al*., 2006). Entretanto, agentes estressores que podem comprometer a absorção do ferro, a malformação ou hemólise dos eritrócitos, a inibição da síntese de hemoglobina e a competição pelo sítio de ligação do oxigênio podem causar uma hemodiluição ou anemia nos peixes, dessa forma, reduzindo a capacidade de transporte de oxigênio (Heath, 1995; Affonso, 2001; Affonso *et al.,* 2004; Tavares-Dias e Moraes, 2004, Das *et al*., 2009). Portanto, as análises hematológicas podem contribuir para avaliar a saúde do animal em sistema de cultivo.

De acordo com os resultados obtidos, a suplementação de glicano e levamisol na dieta de juvenis de tambaqui ao final de 60 dias, bem como após 7 e 15 dias do teste de desafio com a bactéria *A. hydrophila*, não alterou o eritrograma dos peixes. Resultados semelhantes foram obtidos por Andrade *et al.* (2006) para juvenis de matrinxã, *B. amazonicus*, alimentados,

durante 60 dias, com dieta suplementada com vitamina C e submetidos à teste de desafio com *A. hydrophila*, cujos valores dos parâmetros hematológicos não sofreram alterações significativas. Por outro lado, Chagas (2010) observou uma redução nos valores de hemoglobina, hematócrito e número de eritrócitos em juvenis de tambaqui alimentados com 0,1 a 0,8% de β-glucano.kg^{-1} e desafiados com a bactéria *A. hydrophila*, por 15 dias. De acordo com Campbell e Ellis (2007) a ocorrência de anemias hemolíticas é um sinal clínico comum em peixes infectados com *A. hydrophila*, como consequência de hemorragias causadas pela produção e liberação de hemolisina (composto tóxico de origem bacteriana que provoca lise dos eritrócitos). Nesse sentido, a ausência de alterações significativas no eritrograma dos tambaquis, deste estudo, sugere que as infecções causadas pela bactéria *A. hydrophila* não comprometeram a capacidade de transporte de oxigênio do sangue aos tecidos e que a adição de levamisol e glicano na dieta não induziram o estresse nos peixes.

Além dos eritrócitos, os leucócitos e trombócitos também são bons indicadores do estado de saúde dos animais, sendo que alterações na quantidade destas células na corrente sanguínea fornecem informações sobre o sistema imune não específico além de indicar estresse fisiológico em peixes (Bozzo *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2007). Apesar da importância, são poucos os estudos que analisam o leucograma e trombograma, principalmente em peixes tropicais (Affonso *et al*., 2004; Tavares-Dias e Moraes, 2004; Menezes *et al*., 2006; Affonso *et al*., 2007; Andrade *et al*., 2007).

Diversos estudos demonstram que a alimentação suplementada com imunoestimulantes pode elevar o número de leucócitos, conforme foi observado em carpa comum, *C. carpio,* alimentadas com β-glicano (Selvaraj *et al.*, 2006); em matrinxã, *B. amazonicus*, alimentadas com altas doses de vitamina C (Affonso *et al.*, 2007); em pacu, *P. mesopotamicus*, alimentados com vitamina C e E (Garcia *et al.*, 2007) e em pirarucu, *A. gigas* alimentado com vitamina C e E (Menezes *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2007). Contudo, a

quantidade de leucócitos totais dos tambaquis, do presente estudo, não foi influenciada pelas diferentes concentrações de levamisol e glicano suplementadas na dieta. Os valores inferiores de trombócitos encontrados nos animais alimentados com 1 e 10 mg glicano.kg^{-1} na ração, após 60 dias, não foram influenciados pela utilização de glicano, visto que os animais alimentados com 5 mg de glicano.kg^{-1} na ração não apresentaram tal resultado. Biller (2008) também encontrou uma redução no número de trombócitos de pacu após 15 e 30 dias de alimentação com 0,1 e 1,0% de glicano em comparação coms animais suplementados somente durante 7 dias com o imunoestimulante.

O cortisol é considerado o hormônio do estresse, sendo um importante indicador na avaliação do estado de saúde dos peixes (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997), atuando na regulação do equilíbrio hidromineral e metabolismo energético, reduz a taxa de crescimento, suprime a reprodução e o sistema imune dos animais (Wendelaar Bonga, 1997). Segundo a literatura, alguns imunoestimulantes podem atuar inibindo a liberação de cortisol pelos peixes em condições de estresse (Ortuño *el al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2006). No presente estudo, uma vez que os níveis de cortisol dos peixes, mantidos sob condições laboratoriais por 60 dias, nos diferentes tratamentos, não foram alterados, é possível sugerir que as condições do bioensaio estiveram adequadas para o bem estar da espécie, e que as concentrações dos imunoestimulantes testadas não induziram estresse aos peixes, visto que estes poderiam responder negativamente ao tratamento, como demonstrado em outros estudos (Li *et al.*, 2004; Ai *et al.*, 2007). No entanto, o aumento significativo nos níveis cortisol, em todos os tratamentos, após 7 e 15 dias de infecção causada pela *A. hydrophila*, demonstra a ineficiência das concentrações de levamisol e glicano testadas em minimizar o estresse causado pela bactéria. Entretanto, estes resultados evidenciam a importância deste hormônio como indicador de estresse fisiológico em peixes sob condições experimentais.

O aumento da liberação de cortisol induz à hiperglicemia, que ajuda a suprir o aumento da demanda energética dos peixes durante o estresse (Mazeaud *et al.,* 1977; Jeney *et al.,* 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002). Os valores de glicose plasmática obtidos para tambaqui não foram influenciados pelas dietas experimentais, sendo observadas uma redução significativa nos animais suplementados com 100 e 250 mg de levamisol.kg^{-1} após 7 dias de infecção bacteriana, recuperando as concentrações iniciais após 15 dias, demonstrando o restabelecimento da demanda energética dos animais após 15 dias de infecção bacteriana. Resultados semelhantes foram observados por Oliveira (2008) com juvenis de matrinxã suplementadas com levamisol e por Chagas (2010) para juvenis de tambaqui suplementados com glicano.

Outros efeitos secundários observados em peixes em resposta ao estresse são alterações hidroeletrolíticas (Wendelaar Bonga, 1997; Wojtaszek *et al.*, 2002), pois, a elevação das catecolaminas provoca dilatação dos vasos sanguíneos branquiais, aumentando a permeabilidade do epitélio branquial (Wendelaar Bonga, 1997), possibilitando, consequentemente, uma maior perda de íons do sangue para o meio externo e um influxo de água por osmose, resultando em alterações nas concentrações iônicas (Wedemeyer, 1996). Neste estudo, não foram observados desequilíbrios osmorregulatórios, visto que, os níveis de sódio, cloretos, cálcio e potássio do tambaqui permaneceram inalterados ao longo do experimento, demonstrando que a infecção por *A. hydrophila* não comprometeu o balanço hidroeletrolítico dos animais.

De acordo com a literatura, o levamisol e glicano são capazes de reforçar a imunidade inata, aumentando o nível e atividade das lisozimas plasmáticas, além da estimulação da atividade fagocitária dos macrófagos em diferentes espécies de peixes (Jorgensen *et al.,* 1993; Galeotti, 1998; Mulero *et al.,* 1998). O aumento da resistência contra infecções bacterianas foi observada após aplicação de glicano no salmão do atlântico, *Salmo salar* (Robertsen *et al*.,

1990; Raa *et al.*, 1992), em truta arco-íris, *O. mykiss* (Jeney e Andersen, 1993) e em tilápia do Nilo, *O. niloticus* (El-Boshy *et al*., 2010). Das *et al.* (2009) constataram uma redução na taxa de mortalidade e aumento da atividade de lisozima em *Anabas testudineus* previamente infectadas com *A. hydrophila* e submetidas à 3 h de imersão contendo 15 mg de glicano.L^{-1}.

Embora o levamisol e glicano sejam capazes de estimular as defesas não-específicas dos peixes contra infecção, a partir da elevação da expressão da lisozima (Paulsen *et al.*, 2003), no presente estudo, a suplementação desses imunoestimulantes na dieta do tambaqui não ocasionou uma alteração na concentração e atividade de lisozima durante o desafio bacteriano com *A. hydrophila*, apresentando valores inferiores aos encontrados em juvenis de tambaqui e de pacu alimentados com dietas suplementadas com glicano (Abreu, 2007; Biller, 2008; Chagas, 2010). Em estudos utilizando suplementação de glicano na dieta, também não foi observado aumento nos níveis de lisozima em truta arco-íris, *O. mykiss* (Sealey *et al*., 2008), tilápia do Nilo, *O. niloticus* (Whittington *et al*., 2005; Welker *et al*., 2007), bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (Verlhac *et al*., 1998), carpa comum, *C. carpio* (Selravaj *et al*., 2006) e tambaqui (Chagas, 2010).

A suplementação de levamisol e glicano na dieta do tambaqui não impediu a manifestação de sinais clínicos típicos de infecção causada pela bactéria *A. hydrophila* corroborando com os dados obtidos por Biller (2008) que encontrou petéquias, equimoses, lesões ulcerativas na superfície da pele, exoftalmia e distensão abdominal em exemplares de pacu alimentados com glicano e desafiados com *A. hydrophila*. De forma complementar, não foi observada nenhuma mortalidade nos peixes até o 15º dia após a inoculação bacteriana, incluindo os animais do controle, demonstrando, desta forma que os peixes estavam em bom estado fisiológico que os imunoestimulantes não influenciaram de forma efetiva na higidez dos tambaquis.

Efeitos positivos da adição dos imunoestimulantes foram encontrados por Schorer (2008) que observou maior sobrevivência em pacu suplementado com 0,1% de glicano e submetido ao desafio com a bactéria *A. hydrophila* em comparação ao controle. Chagas (2010), estudando juvenis de tambaqui, observou que 0,1% de glicano promoveu uma maior sobrevivência dos animais, após desafio com a bactéria *A. hydrophila*.

Os resultados obtidos permitem concluir que a suplementação de levamisol e glicano na dieta do tambaqui, nas concentrações testadas, não proporcionou uma melhoria no desempenho zootécnico e no perfil fisiológico dos juvenis de tambaqui após 60 dias. Além disso, estes imunoestimulantes não foram capazes de minimizar as respostas de estresse causadas pela infecção por *A. hydrophila*. Contudo, para se obter resultados mais conclusivos sobre o efeito do levamisol e glicano como imunoestimulante para o tambaqui, sugere-se a realização de estudos com concentrações mais elevadas que as testadas neste trabalho, além da avaliação de diferentes períodos de suplementação.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Temático de Solos e Plantas, ao Laboratório de Ecologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, à CAPES e FAPEAM pela bolsa concedida, e FAPEAM (Processo Nº 2106/2007) pelo financiamento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, J.S. 2007. *Suplementação alimentar de pacu (Piaractus mesopotamicus Holmberg 1887) com β 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura*. Tese de Doutorado Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 123p.

Abreu, J.S; Marzocchi-Machado, C.M.; Urbaczek, A.C.;Fonseca, L.M.; Urbinati, E.C. 2009. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Brazilian Journal Biology*, 69(4): 1133-1139.

Affonso, E.G. 2001. Respiratory characteristics of *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae). *Acta Amazônica*, 31(2): 249-262.

Affonso, E.G.; Polez, V.L.P.; Mazon, A.F.; Araújo, M.R.R.; Moraes, G.; Rantin, F.T. 2004. Physiological responses to sulfide toxicity by the air-breathing catfish, *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 139: 251-257.

Affonso, E.G.; Silva, E.C.; Tavares-Dias, M.; Menezes, G.C.; Carvalho, C.S.M.; Nunes, E.S.S.; Ituassú, D.R.; Roubach, R; Ono, E.A.;. Fim, J.D.I.; Marcon. J.L. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses R.R of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* A, 147: 383-385.

Ai, Q.; Mai; K.; Zhang, l.; Tan, B.; Zhang, W.; Xu, W.; Li, H. 2007. Effects of dietary β-1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*. 22: 394-402.

Anderson, D.P.; Jeney, G. 1992. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhances the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 34:379-389.

Anderson, D.P.; Siwicki, A.K.; Dixon, O.W.; Lizzi, E.F. 1989. Immunostimulation by levamisole in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in vivo. In: *Viruses of Lower Vertebrates* (ed. by W.Ahne & E. Kurstak). Springer-Verlag, New York, USA. p. 469-78.

Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Brasil, E.; Matsura T.; Affonso, E.G. 2006. Influência da vitamina C na dieta da matrinxã, (*Brycon amazonicus*) após infecção por Aeromonas hydrophila. In: *Anais da X Jornada de Iniciação Científica*, PIBIC/INPA, Manaus.

Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Menezes, G.C.; Brasil, E.M.; Roubach, R.; Urbinati, E.C.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Compative Biochemistry and Physiology* A, 146: 576-580.

Arana, L. V. 1997. *Princípios químicos de qualidade de água em aqüicultura: uma revisão para peixes e camarões*. UFSC, Florianópolis. 166p.

Araújo-Lima, C.; Gomes, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Baldisseroto, B.; Gomes, L.C. (Ed.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 175-202.

Aride, P.H.R.; Roubach, R.; Val, A.L. 2007. Tolerance response of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquaculture Research*. 38: 588-594.

Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative Comparative Biology*. 42: 517-525.

Barton, B.A.; Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.

Biller, J.D. 2008. *Respostas fisio-patológicas e desafio por Aeromonas hydrophila em pacu alimentado com ração suplementada com β 1,3 glicano.* Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo. 114p.

Boyd, C.E. 1981. Water Quality in warm water fish ponds, Anburn University. Alabama 359p.

Boyd, C.E.; Tucker, C.S. 1992. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn: Auburn University. 183p.

Bozzo, F.R.; Moraes, J.R.E.; Moraes; F.R.; Pereira; G.T.; Tavares-Dias; M.; Onaka, E.M. 2007. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (characidae). *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2): 302-308.

Campbell, T.W.; Ellis, C.K. 2007. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.

Carvalho, C.S.; Fernandes, M.N. 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, 251(1): 109-117.

Chagas, E.C. 2010. *β glucano e nucleotídeos para tambaquis (Colossoma macropomum) vacinados e desafiados com Aeromonas hydrophila: Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 141p.

Choudhry, D.; Pal, A.K.; Sahu, N.P; Kumar, S.; Das, S.S.; Mukherjee, S.C. 2005. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(3): 281-291.

Cook, M.T.; Hayball, P.J.; Hutchinson, W.; Nowak, B.F.; Hayball, J.D. 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoAtiva™ as feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper, *Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider) in winter. *Fish & Shellfish Immunology*, 14: 333-345.

Costa, O.T.F.; Ferreira, D.J.S.; Mendonça, F.L.P.; Fernandes, M.N. 2004. Susceptibilidade of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, 232: 627-636.

Cuesta, A.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. 2002. Levamisole is potent enhancer of gilthead sea bream natural cytotoxic activity. *Veterinary Immunology and immunopathology*, 89:169-174.

Das, B.K.; Pradhan, J.; Sahu, S. 2009. The effect of Euglen viridis on immune response of rohu, Labeo rohita (Ham.). *Fish & Shellfish Immunology*, 26(6): 871-876.

Dautremepuits, C.; Fortier, M.; Croietiere, S.; Belhumeur, P.; Fournier, M. 2006. Modulation of juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*) cellular immune system after *Aeromonas salmonicida* challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110: 27-36.

Di Giulio, R.T.; Hinton, D.E. 2008. *Toxicology of fishes*. CRC Press, USA.

El-Boshy, M.E.; El-Ashram, A.M.; AbdelHamid, F.M.; Gadalla, H.A. 2010. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β-glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila. Fish & shellfish Imunnology,* 28: 802-808.

Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assays. In: Stolen, J.S.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Roberson, B.S.; Muiswinkel, W.B. (Eds). *Techniques in fish Immunology*. USA:SOS publications, 101-103.

Engstad, R.E.; Robertsen, E.; Frivold, E. 1992. Yast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish & Shellfish Immunology*, 2: 287-292.

Falcon, D.R. 2007. *β glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parametros fisiopatológicos em juvenile de tilapia do nilo: nível de suplementação e tempo de administração*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. São Paulo. 146p.

Findllay, V.L.; Munday, B.L. 2002. The immunomodulatory effects of levamisole on the non-specific immune system of Atlantic salmon, *Salmon salar L*. *Journal of fish Diseases*, 23: 369-378.

Galeotti, M. 1998: Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. *Journal of Applied Ichthyology,* 14, 189-199.

Gandra, A.L. 2010. O *mercado de pescado da região metropolitana de Manaus*. Proyecto: Mejoramento del Acceso los Mercados de Productos Pesqueros y Acuículas CFC/FAO/INFOPESCA. CFC/FSCFT/28.

Garcia, F.; Pilarski, F.; Onaka, E.M.; Moraes, F.R.; Martins, M.L. 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 271: 39-46.

Heath, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*, second ed. Lewis Publishers, Boca Raton.

Herrero, A.I.; Sandi, C.; Venero, C. 2006. Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. *Neurobiology of Learning and Memory,* 86: 150–159.

Iwana, G.; Afonso, L.; Todghan, A.; Ackerman, P.; Nakaro, K. 2004. Are Hpsp suitable for indicationg stresse status in fish? *The Journal of Experimental Biology*, 20: 15-19.

Jeney, G.; Anderson, D.P. 1993. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. *Fish & Shellfish Immunology*, 3: 51-58.

Jeney, G.; Galeotti, M.; Volpatti, D.; Jeney, Z.; Anderson, D.P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154(1): 1-15.

Jorgesen, J.B.; Sharp, G.J.E.; Secombest, C.J., Robertsen, B. 1993. Effect of yeast cell wall glucan on the bactericidae activity of rainbow trout macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 3: 267-277.

Kajita, Y.; Sakai, M.; Atsuta, S.; Kobayashi, M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathology*, 25: 93-98.

Kozinska, A.; Guz, A. 2004. The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio L*.). *Fish & shellfish Immunology*, 16: 475-491.

Kubtiza, F. 2003. *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. Jundiaí. 229p.

Kumari, J.; Swain, T.; Sahoo, P.K. 2003. Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistence in Asian catfish, *Clarias batracus. Veterinary immunology and Immunopatology*, 94: 1-9.

Leano, E.M.; Guo, J.J.; Chang, S.L.; Liao, I.C. 2004. Levamisole enhances non specific immune responses of cobia, *Ranchycention canadum*, fingerlings. *Journal of Fisheries Society of Taiwan*, 30: 321-330.

Li, P.; Wang, X.; Gatlin III, D.M. 2004. Excessive dietary levamisole suppresses growth performance of hybrid "striped bass", *Morone chrysops x M. saxatilis*, and elevated levamisole *in vitro* impairs macrophage function. *Aquaculture Research*, 35: 1380-1383.

Li, P.; Wang, X.; Gatlin III, D.M. 2006. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture*, 251: 201-209.

Martins, M.L. 2000. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1817) estressados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 125p.

Marzocchi-Machado, C.M.; Polizello, A.C.; Azollini, A.E.; Lucisano-Valin, Y.M. 1999. The influence of antibody functional of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. *Immunologied Investigations*, 28: 89-101.

Mazeaud, M.M.; Mazeaud, F.; Donaldson, E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 201-212.

Melo, L.A.S.; Izel, A.C.U.; Rodrigues, F.M. 2001. *Criação de tambaqui (Colossoma macropomum) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas*. Embrapa Amazônia Ocidental. 25p.

Menezes, G.C.; Tavares-Dias, M.; Ono, E.A.; Andrade, J.I.A.A.; Brasil, E.M.; Roubach, R.; Urbinati, E.C.; Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145: 274–279.

Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. 2010. *Produção Pesqueira e Aquícola: Estatistica 2008 e 2009*. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília.

Misra, C.K.; Das, B.K.; Mkherje, S.C.; Pattnai, K.P. 2006. Effect of multiple injections of β-glucan on non-specific immune response and disease resistence in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 305-319.

Monteiro, D.; Marrero, M.; Izquierdo, M.S.; Robaina, L., Vergara, J.M; Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation in some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture,* 171: 269-278.

Mulero, V.; Esteban, M.A.; Munoz, J.; Meseguer, J. 1998. Dietary intake of levamisole enchances the immune rresponse and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 8: 49-62.

Oliveira, S.R. 2008. *Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse de transporte do matrinxã, Brycon amazonicus*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas.

Oliveira, S.R.; Souza, R.T.Y.B.; Brasil, E.M.; Andrade, J.I., Nunes, E.S., Ono, E.A., Affonso, E.G. 2011. LD_{50} of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus. Acta Amazônica*, 41(2): 321-326.

Ortuño, J.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 14: 145–156.

Palic, D., Andreasen, C. B., Herolt, D. M., Menzel, B. W., Roth, J. A. 2006. Immunomodulatory effects of β-glucan on neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820) *Developmental & Comparative Immunology.* 30: 817-830.

Paulsen, S.M.; Lunde, H.; Engstad, R.E.; Robertsen, B. 2003. In vivo effects of *β*-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Fish & Shellfish Immunology,* 14: 39–54.

Pavanelli, G.C.; Eiras, J.C; Takemoto, R.M. 2010. *Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Universidade Estadual de Maringá. 4. Ed. 311p.

Raa, J.; Rostad, G.; Engstad, R.; Robertson, B. 1992. The use of immunostimulants to increase resitance of aquatic organisms to microbial infections. In: sheriff, M.; Subasinghe, R.P.; Arthur, J.R. (Eds) *Diseases in Asian Aquaculture*. Manila: Fish health section. *Asian fisheries Society,* 39-50p.

Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A. 2004. *Sanidade de Organismos Aquáticos.* São Paulo. 426p.

Renoux, G. 1980. The general immunopharmocology of levamisole. *Drugs*, 19: 89-99.

Robertsen, B. 1999. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish & Shellfish Immunolog*y, 9: 269-290.

Robertsen, B.; Rorstad, G.; Engstad, R.; Raa, J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Fish Diseases*, 13: 391-400.

Sado, R.Y. 2008. *Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887)*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo–Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz. Piracicaba - SP. 136p.

Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.

Schorer, M. 2008. *Utilização do β-glucano sobre o desempenho produtivo, indicadores de estresse, perfil hematológico e sobrevivência do pacu, Piaractus mesopotamicus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo. 96p.

Sealey, W.M.; Barrows, F.T.; Hong, A.; Johansen, K.A.; Oliverturf, K.; Lopatra, S.E.; Hardy, R.W. 2008. Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of β-glucan to alter growth and disease resistence of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Animal Feed Science and Technology*. 141: 115-128.

Selvaraj, V.; Sampath, K.; Sekar, V. 2004. Extraction and characterization of lipopolysaccharide fron *Aeromonas hydrophila* and its effects on survival and hematology of the carp, *Cyprinus carpio*. *Asian Fisheries Science,* 17: 163-173.

Selvaraj, V.; Sampath, K.; Sekar, V. 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of β-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114: 15-24.

Selvaraj, V.; Sampath, K.; Sekar, V. 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19: 293-306.

SEPA/SEPROR. 2010. *Integração dos setores agropecuário, florestal e pesqueiro: Cadeia produtiva da pesca e aqüicultura.* Secretaria Estadual da Pesca e Aquicultura, Amazonas.

Siwicki, A.K. 1989. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Developmental and Comparative Immunology*, 13: 87-91.

Siwicki, A.K.; Anderson, D.P.; Dixon, O.W. 1990. In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. *Developmental and Comparative Immunology*, 14: 231-237.

Siwicki, A.K.; Anderson, D.P.; Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology Immunophatology*, 41: 125-139.

Tavares-Dias, M.; Ishicawa, M.M.; Martins, M.L.; Satake, F.; Hisano, H. Pádua, S.B.; Geronimo, G.T.; Santana, A.R. 2009. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixe em cultivo. In: Saran-Neto, M.; Pozzobon-Soria, W.S. (eds) *Tópicos especiais em saúde e criação animal*. São Carlos: Pedro e João editores. 43-72p.

Tavares-Dias, M.; Melo, J.F.B.; Moraes, G.; Moraes, F.R. 2002. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do Jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*, 32(4): 693-698.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2003. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal*, 19: 103-110.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Villimpress. 143p.

Tavares-Dias, M; Moraes, F.R. 2010. Biochemical parameters for *Piaractus mesopotamicus, Colossoma macropomum* (Characidade) and hybrid tambacu (*P. mesopotamicus x C. macropomum*). *Ciência Animal Brasileira*, 11(2): 363-368.

Trenzado, C.E.; Morales, A.E.; Higuera, M. 2006. Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture*, 258: 583–593.

Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1995. *Fishes of the Amazon and their Environment. Physiological and Biochemical Features.* Heidelberg : Springer-Verlag.

Vazques, G.R.; Guerrero, G.A. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Peciformes). *Tissue and cell*, 39: 151-160.

Ventura, M.T., Grizzle, J.M. 1998. Lesion associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal Fish Diseases*, 11: 397-407.

Verdouw, H.; Van Echted, C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Research*, 12(6): 397-402.

Verlhac,V.; Obach, A.; Gabaudam, J., Schuep,W., Hole, R. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 8: 409-424.

Wedemeyer, G.A. 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. *In*: Chapman & Hall New York, p. 232.

Welker, T. L.; Lim, C.; Yildrim-Aksy, M.; Shelby, R.; Klesius, P. H. 2007. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell or yeast subcomponents. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38: 24-35.

Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77: 591-625.

Whittington, R.; Lim, C.; Klesius, P.H. 2005. Effect of dietary β-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus. Aquaculture*, 248: 217-225.

Wojtaszek, J., Dziewulska-Szwajkowska, D., Lozinska-Gabska, M., Adamowicz, A., Dzugaj, A. (2002). Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. *General and Comparative Endocrinology*, 125: 176-183.

Won, K. M.; Kim, S. M.; Park, S.I. 2004. The effects of b-1,3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthyes olivaceus* by oral administration. *Journal of Fish Pathology*, 17: 29-38.

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas da água dos tanques utilizados na criação de juvenis de tambaqui (*Colossomam macropomum*) alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de levamisol (L100, L250, L500 com 100, 250 e 500 mg de levamisol.kg^{-1} ração) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg de glicano.kg^{-1} de ração), por um período de 60 dias. Valores são média ± desvio padrão.

Tratamentos	**Variáveis físicas e químicas da água**								
	Oxigênio ($mg.L^{-1}$)	Temperatura (ºC)	pH	Condutividade ($\mu S.cm^{-1}$)	Amônia Total ($mg.L^{-1}$)	Nitrito ($mg.L^{-1}$)	Alcalinidade ($mg\ CaCO_3.L^{-1}$)	Dureza ($mg\ CaCO_3.L^{-1}$)	CO_2 ($mg.L^{-1}$)
Controle	6,59 ± 0,18	28,37 ± 0,13	5,59 ± 0,12	20,33 ± 0,19	0,052 ± 0,01	0,004 ± 0,01	18,13 ± 0,86	14,79 ± 0,60	15,5 ± 2,2
L100	6,65 ± 0,19	27,91 ± 0,09	5,54 ± 0,11	20,66 ± 0,45	0,065 ± 0,02	0,003 ± 0,02	18,18 ± 1,04	15,37 ± 0,53	13,5 ± 2,3
L250	6,42 ± 0,42	28,43 ± 0,10	5,08 ± 0,14	20,79 ± 0,52	0,053 ± 0,01	0,003 ± 0,00	16,87 ± 0,65	18,56 ± 1,28	13,2 ± 1,5
L500	6,56 ± 0,21	28,09 ± 0,07	5,21 ± 0,10	20,62 ± 0,34	0,062 ± 0,03	0,004 ± 0,01	17,06 ± 0,92	19,45 ±1,42	13,3 ± 1,1
G1	6,34 ± 0,21	28,13 ± 0,61	5,40 ± 0,12	19,88 ± 0,33	0,054 ± 0,02	0,001 ± 0,01	17,80 ± 0,60	17,41 ± 1,35	15,5 ± 3,3
G5	6,89 ± 0,10	28,10 ± 0,14	5,50 ± 0,17	20,08 ± 0,21	0,047 ± 0,01	0,002 ± 0,01	18,08 ± 0,76	18,33 ± 1,52	13,2 ± 1,5
G10	6,50 ± 0,08	28,18 ± 0,08	5,96 ± 0,34	21,34 ± 0,47	0,051 ± 0,01	0,004 ± 0,01	17,95 ± 0,85	18,24 ± 0,82	14,2 ± 3,0

Tabela 2. Variáveis físicas e químicas da água dos tanques utilizados na criação de juvenis de tambaqui (*Colossomam macropomum*) alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de levamisol (L100, L250, L500 com 100, 250 e 500 mg de levamisol.kg^{-1} ração) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg de glicano.kg^{-1} de ração), após 7 dias de infecção bacteriana. Valores são média ± desvio padrão.

Tratamentos	**Variáveis físicas e químicas da água**								
	Oxigênio (mg.L^{-1})	Temperatura (ºC)	pH	Condutividade (µS.cm^{-1})	Amônia Total (mg.L^{-1})	Nitrito (mg.L^{-1})	Alcalinidade (mg $CaCO_3$.L^{-1})	Dureza (mg $CaCO_3$.L^{-1})	CO_2 (mg.L^{-1})
Controle	6,33 ± 0,12	29,42 ± 0,15	5,82 ± 0,18	23,46 ± 0,38	0,066 ± 0,01	0,003 ± 0,01	15,43 ± 0,68	18,54 ± 1,2	10,6 ± 2,9
L100	6,28 ± 0,12	28,71 ± 0,12	5,41 ± 0,28	28,19 ± 1,67	0,072 ± 0,02	0,004 ± 0,02	12,69 ± 1,43	16,38 ± 0,5	11,5 ± 1,7
L250	6,57 ± 0,35	28,59 ± 0,12	5,34 ± 0,45	25,31 ± 0,87	0,069 ± 0,01	0,005 ± 0,00	14,45 ± 0,82	15,92 ± 1,69	12,4 ± 1,9
L500	6,12 ± 0,15	29,17 ± 0,25	5,34 ± 0,17	27,31 ± 0,67	0,073 ± 0,03	0,003 ± 0,01	13,45 ± 0,56	18,92 ±1,86	14,1 ± 2,5
G1	6,15 ± 0,29	28,54 ± 0,17	5,20 ± 0,4	23,86 ± 0,45	0,062 ± 0,02	0,004 ± 0,01	15,72 ± 0,96	15,45 ± 1,67	13,2 ± 3,4
G5	6,72 ± 0,14	28,35 ± 0,17	5,90 ± 0,9	24,85 ± 1,42	0,071 ± 0,01	0,005 ± 0,01	16,27 ± 1,40	14,95 ± 1,23	15,2 ± 1,6
G10	6,80 ± 0,35	28,92 ± 0,17	5,82 ± 0,45	27,47 ± 1,58	0,067 ± 0,01	0,006 ± 0,01	14,76 ± 0,67	17,56 ± 0,93	12,6 ± 4,2

Tabela 3. Variáveis físicas e químicas da água dos tanques utilizados na criação de juvenis de tambaqui (*Colossomam macropomum*) alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de levamisol (L100, L250, L500 com 100, 250 e 500 mg de levamisol.kg^{-1} ração) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg de glicano.kg^{-1} de ração), após 15 dias de infecção bacteriana. Valores são média ± desvio padrão.

Tratamentos	**Variáveis físicas e químicas da água**								
	Oxigênio ($mg.L^{-1}$)	Temperatura (ºC)	pH	Condutividade ($\mu S.cm^{-1}$)	Amônia Total ($mg.L^{-1}$)	Nitrito ($mg.L^{-1}$)	Alcalinidade ($mg\ CaCO_3.L^{-1}$)	Dureza ($mg\ CaCO_3.L^{-1}$)	CO_2 ($mg.L^{-1}$)
Controle	6,01 ± 0,34	29,21 ± 0,43	5,92 ± 0,10	22,36 ± 0,84	0,071 ± 0,02	0,005 ± 0,01	15,75 ± 0,92	12,93 ± 0,10	10,72 ± 1,30
L100	6,25 ± 0,90	28,73 ± 0,17	5,75 ± 0,12	25,43 ± 0,75	0,068 ± 0,01	0,003 ± 0,01	15,85 ± 1,48	13,81 ± 1,50	13,85 ± 2,35
L250	6,52 ± 0,93	29,72 ± 0,27	5,47 ± 0,35	22,98 ± 0,71	0,063 ± 0,02	0,004 ± 0,01	14,92 ± 0,95	14,32 ± 1,65	11,42 ± 1,80
L500	6,04 ± 0,85	28,91 ± 0,45	5,74 ± 0,84	24,21 ± 0,93	0,065 ± 0,02	0,003 ± 0,02	15,74 ± 1,32	15,72 ±1,78	12,74 ± 1,45
G1	6,72 ± 0,83	29,72 ± 0,53	5,78 ± 0,75	23,82 ± 0,22	0,067 ± 0,03	0,002 ± 0,01	14,87 ± 1,73	12,98 ± 1,71	12,27 ± 1,60
G5	6,78 ± 0,51	28,90 ± 0,87	5,95 ± 0,45	21,72 ± 0,45	0,052 ± 0,02	0,004 ± 0,01	15,67 ± 1,29	14,37 ± 1,74	10,78 ± 1,82
G10	6,21 ± 0,42	28,79 ± 0,65	5,97 ± 0,72	23,75 ± 0,50	0,059 ± 0,04	0,005 ± 0,01	16,06 ± 1,56	15,67 ± 1,20	11,72 ± 2,53

Tabela 4. Consumo diário de ração (CDR), ganho de peso (GP), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), fator de condição (FC), coeficiente de variação do crescimento (CV), taxa de sobrevivência (TS) e produção por área (P/A) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, suplementados com diferentes níveis de inclusão de levamisol (L100, L250, L500 com 100, 250 e 500 mg de levamisol.kg^{-1} ração) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg de glicano.kg^{-1} de ração) por um período de 60 dias. Valores são média ± desvio padrão.

Tratamentos	**Parâmetros zootécnicos**							
	CDR (g)	GP (g)	CAA	TCE	FC	CV	TS (%)	P/A (peixes/m^2)
Controle	3,61 ± 0,5	43,8 ± 2,2	2,17 ± 0,5	2,29 ± 0,6	3,31 ± 0,4	10,5 ± 1,2	100,0	60,0
L100	3,06 ± 0,6	47,7 ± 1,7	2,05 ± 1,2	2,50 ± 0,4	3,20 ± 0,4	6,8 ± 1,4	100,0	60,0
L250	3,14 ± 0,4	50,9 ± 2,1	1,88 ± 0,9	2,48 ± 0,2	3,36 ± 0,3	8,7 ± 1,2	100,0	60,0
L500	3,05 ± 0,6	48,3 ± 2,8	1,95 ± 1,1	2,68 ± 0,4	3,37 ± 0,5	8,3 ± 0,9	100,0	60,0
G1	3,42 ± 0,3	47,4 ± 3,2	2,15 ± 0,8	2,37 ± 0,4	3,50 ± 0,3	8,9 ± 1,4	100,0	60,0
G5	3,67 ± 0,4	50,7 ± 3,4	2,02 ± 0,7	2,32 ± 0,3	3,05 ± 0,4	8,6 ± 1,3	100,0	60,0
G10	3,78 ± 0,5	45,4 ± 2,3	2,52 ± 0,6	2,10 ± 0,5	3,26 ± 0,6	7,6 ± 1,7	100,0	60,0

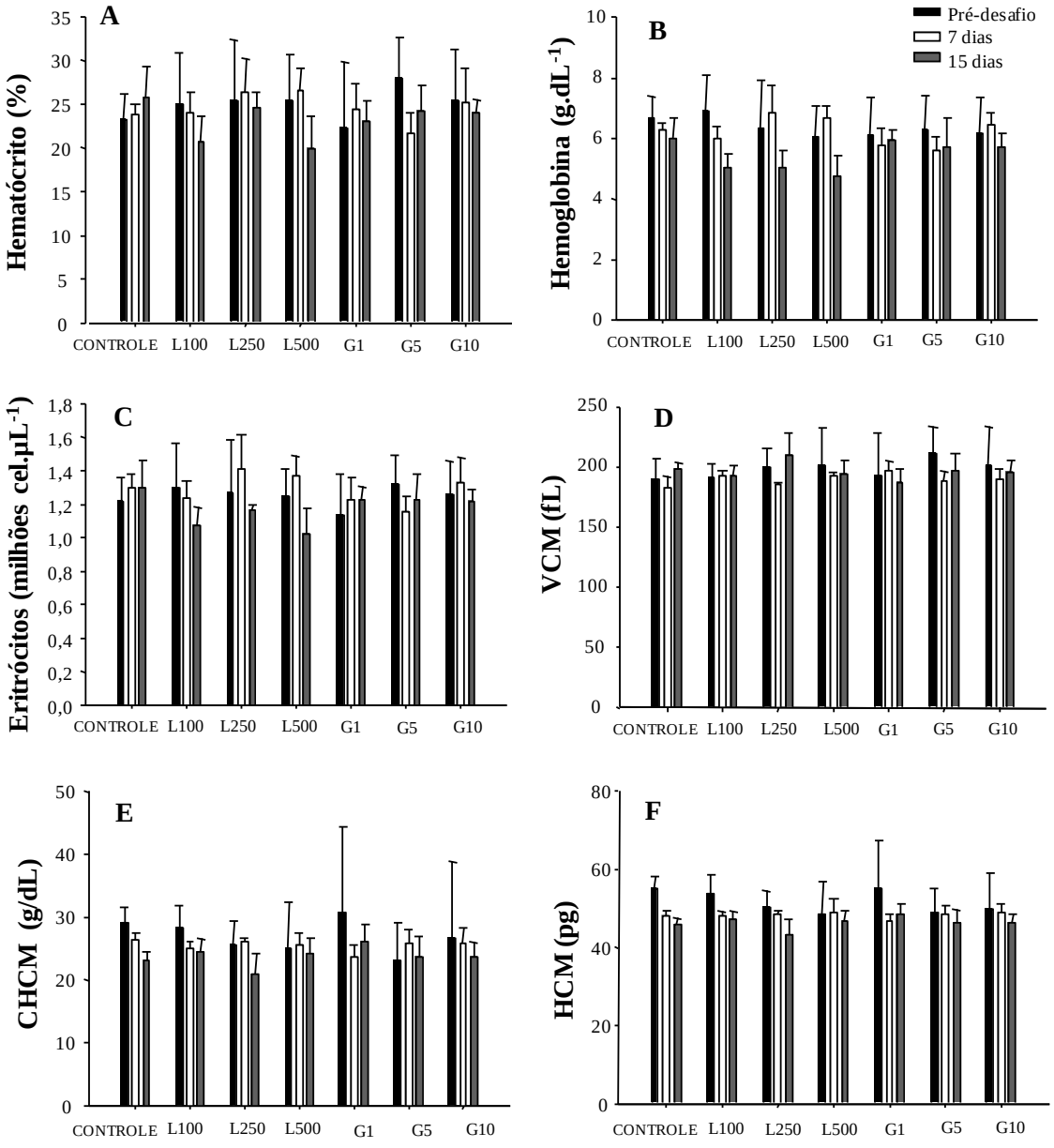

Figura 1. Hematócrito (A), concentração de hemoglobina (B), número de eritrócitos (C), volume corpuscular médio - VCM (D), concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM (E) e hemoglobina corpuscular média - HCM (F) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com 100, 250 e 500 mg levamisol.kg^{-1} (L100, L250 e L500) e 1, 5 e 10 mg glicano.kg^{-1} (G1, G5 e G10) e o controle (sem adição de imunoestimulantes), por 60 dias (pré-desafio) e após 7 e 15 dias de infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Média ± DP.

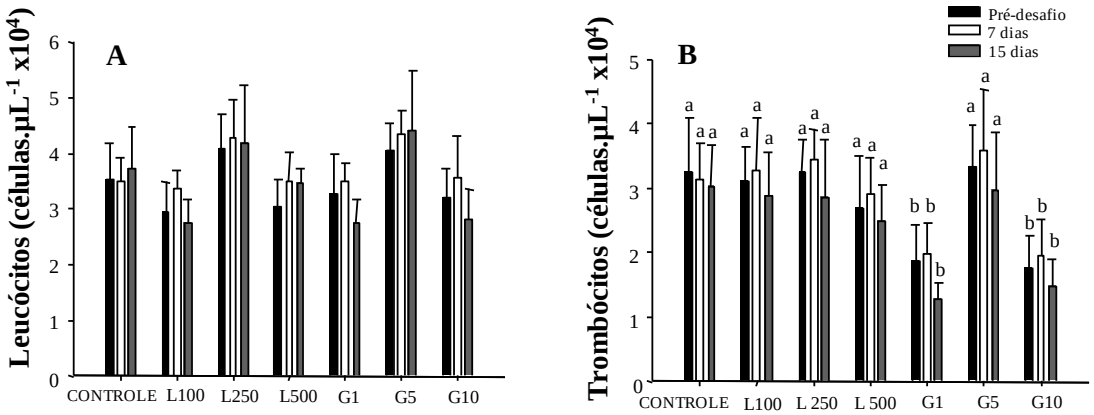

Figura 2. Número de leucócitos (A) e trombócitos (B) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de inclusão de levamisol (L100, L250 e L500 com 100, 250 e 500 mg.kg^{-1}) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg.kg^{-1}) e o controle (sem adição de imunoestimulantes), por 60 dias (pré-desafio) e após 7 e 15 dias de infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Média ± DP. Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p<0,05$).

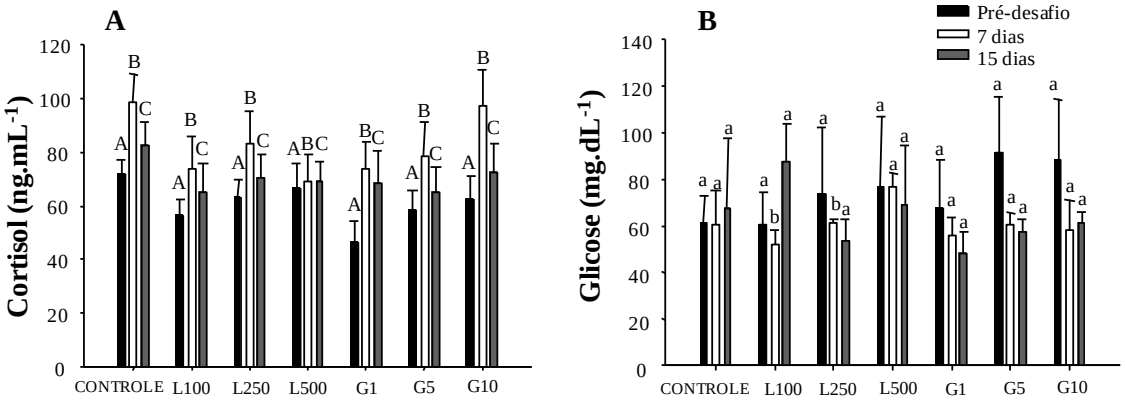

Figura 3. Concentração de cortisol plasmático (A) e glicose plasmática (B) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de inclusão de levamisol (L100, L250 e L500 com 100, 250 e 500 mg.kg^{-1}) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg.kg^{-1}) e o controle (sem adição de imunoestimulantes), por 60 dias (pré-desafio) e após 7 e 15 dias de infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Média ± DP. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os períodos em cada tratamento.

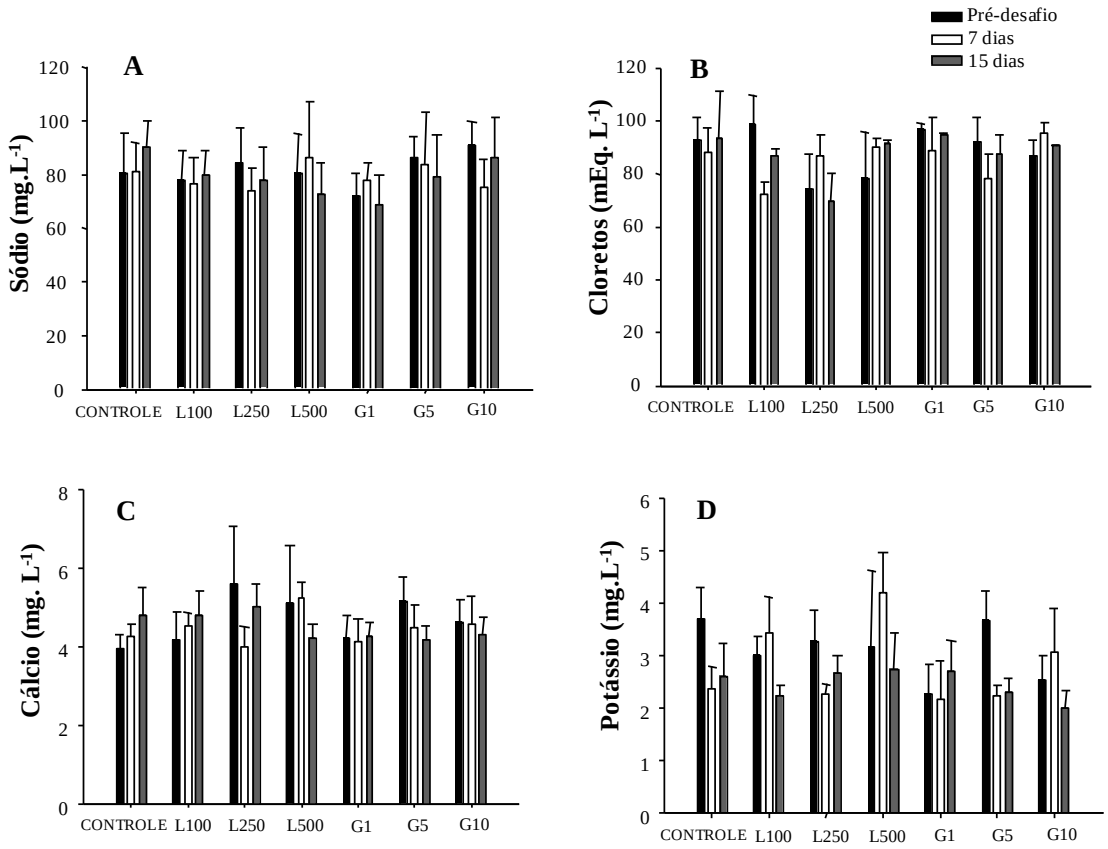

Figura 4. Concentração dos íons plamáticos sódio (A), cloretos (B), cálcio (C) e potássio (D) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de inclusão de levamisol (L100, L250 e L500 com 100, 250 e 500 mg. kg^{-1}) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg. kg^{-1}) e o controle (sem adição de imunoestimulantes), por 60 dias (pré-desafio) e após 7 e 15 dias de infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Média ± DP.

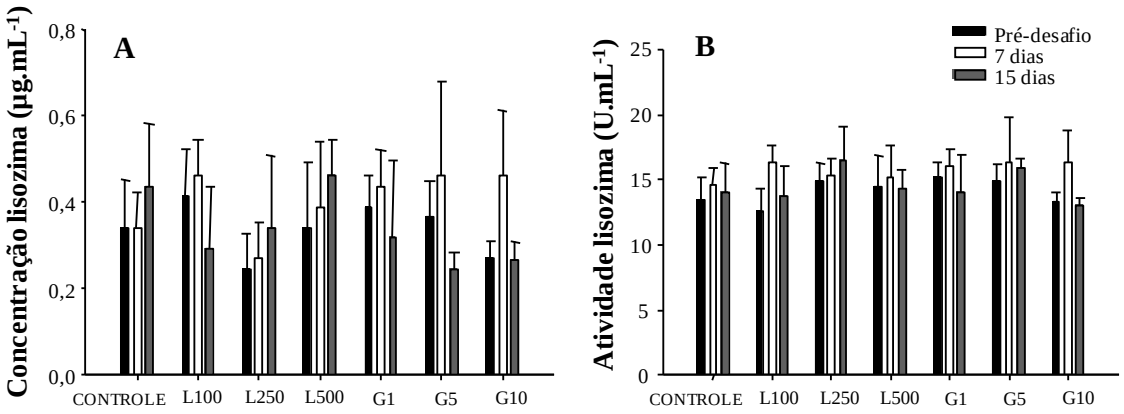

Figura 5. Concentração (A) e atividade de lisozima (B) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de inclusão de levamisol (L100, L250 e L500 com 100, 250 e 500 mg.kg^{-1}) e glicano (G1, G5 e G10 com 1, 5 e 10 mg.kg^{-1}) e o controle (sem adição de imunoestimulantes), por 60 dias (pré-desafio) e após 7 e 15 dias de infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Média ± DP.

CAPÍTULO 3

Efeito da suplementação de levamisol e glicano nas respostas sanguíneas de tambaqui, *Colossoma macropomum*, durante o estresse do transporte

Normas de acordo com a Revista da Acta Amazonica

Efeito da suplementação de levamisol e glicano nas respostas sanguíneas de tambaqui, *Colossoma macropomum*, durante o estresse do transporte

Ana Maria Dias da SILVA e-mail: anadias17@hotmail.com

Elenice Martins BRASIL e-mail: nice@hotmail.com

Iracimar Batista do CARMO e-mail: yarabyo@yahoo.com.br

Kamila Oliveira dos SANTOS email: kamilaos@hotmail.com

Marcio Quara de Carvalho SANTOS email: marcioquara@hotmail.com

Elizabeth Gusmão AFFONSO e-mail: pgusmao@hotmail.com

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Av. André Araújo, 2936, Aleixo. Caixa postal: 478, CEP: 69060-0001 – Manaus, Amazonas, Brasil

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de levamisol e glicano como mitigador do estresse do tambaqui, criados em sistema intensivo de tanques-rede, durante e após o transporte. Para isto, foram utilizados 3 tratamentos, em triplicatas, sendo: TR1 (controle - sem adição de imunoestimulante); TR2 (com 250 mg de levamisol.kg^{-1} ração) e TR3 (5 mg de glicano.kg^{-1} ração). Após 60 dias de alimentação com levamisol e glicano, os peixes foram transportados num veículo por 6 horas, em sistema fechado. Foram avaliadas as respostas de estresse por meio de indicadores hematológicos, bioquímicos e imunológicos, antes e imediatamente após o transporte, e em 24, 48 e 96 h de recuperação. Os resultados de qualidade da água das sacolas apresentaram diferenças significativas após o transporte, em todos os tratamentos, entretanto, os valores obtidos estão dentro dos limites tolerados para a espécie que apresentou 100% de sobrevivência. Imediatamente após o transporte, houve um aumento significativo dos níveis plasmáticos de cortisol e glicose, assim como da concentração e atividade da lisozima, em todos os tratamentos, retornando aos níveis iniciais após 24 h de recuperação. Foi observado um aumento no hematócrito, hemoglobina, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina corpuscular média e hemoglobina corpuscular média 24 h após o transporte, seguida de retorno aos níveis iniciais após 96 h. Os íons plasmáticos Na^+, K^+ e Ca^{2+} apresentaram variações significativas durante o período de recuperação, não retornando aos valores iniciais após 96 h. Os resultados deste estudo permitiram concluir que as alterações dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos ocorreram nas primeiras 24 h após o transporte e que a suplementação com levamisol e glicano não foi capaz de minimizar os efeitos fisiológicos causados pelo estresse de transporte em juvenis de tambaqui, os quais demonstraram capacidade adaptativa em manter a homeostase fisiológica.

Palavras-chave: Cultivo, estresse, imunoestimulante, tambaqui, transporte

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the physiological stress responses of juvenile tambaqui fed levamisole and glucan diets to transport. It was performed three treatments with three repetitions each: TR1 (control diet without immunostimulant); TR2 (diet supplemented with 250 mg levamisole.kg^{-1}) e TR3 (diet supplemented with 5 mg glucan.kg^{-1}). Fish were fed during 60 days previous to transport exposure. Fish were transported in plastic bags during 6 h, and stress parameters measured before and immediately after transport. Fish were allowed to recover and stress measured after 24, 48 e 96 h. Transport water quality significantly decreased, and it was observed significant differences among treatments, but values were all in the tolerance species range and no mortality was observed. Plasma cortisol, glucose and lysozyme activity increased immediately after transport in all treatments. Blood hemoglobin decreased in all groups after transport while hematocrit, red blood cells, hemoglobin, total celular hemoglobin increased after 24 h recovery. Ca^{2+} and K^+ increased after transport and Na^+ after 24 h recovery. Cl^- changed but differences were not significant. The results allowed to observe that blood, biochemical and immunological responses occurs in the first 24 h of recovery, and glucan and levamisole in diet could not minimize stress responses to transport in juvenile tambaqui.

Keywords: stress, immunostimulant, levamisole, glucan, transport, *Colossoma macropomum*

1. INTRODUÇÃO

A criação de peixes em tanques-rede na região amazônica é uma técnica promissora por conciliar o uso sustentável do meio ambiente com uma alta produtividade, oriunda da utilização de elevadas densidades de estocagem (Ono, 2005; Chagas, 2010). Esse tipo de sistema de produção de tambaqui, por ser uma prática de criação recente, ainda não possui informações suficientes sobre os parâmetros zootécnicos e fisiológicos. Os poucos trabalhos existentes têm registrado bons índices de produção e sobrevivência, demonstrando a boa adaptação desta espécie aos tanques-rede (Chagas *et al.*, 2003; Brandão *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2004; Baldisseroto e Gomes, 2005; Chagas *et al.*, 2007; Carmo *et al.*, 2010), assim como para matrinxã, *Brycon amazonicus* (Brandão *et al*., 2005; Tortolero, 2010) e pirarucu, *Arapaima gigas* (Cavero *et al*., 2003; Menezes *et al*., 2006)

Apesar de resultados satisfatórios, a utilização de tanques-rede requer cuidados especiais, pois, a alta densidade de estocagem, a baixa renovação da água e as oscilações bruscas que podem ocorrer no ambiente de cultivo, podem induzir os peixes ao estresse, e, consequentemente, prejudicar a produtividade do sistema e até mesmo causar elevadas taxas de mortalidade (Gomes *et al.*, 2006; Chagas *et al.*, 2007).

Na piscicultura, os peixes são expostos, frequentemente, à procedimentos estressores, pois, em todas as fases da criação, são comuns as práticas que causam estresse (Wedemayer, 1996; Carneiro *et al*., 2009). Dentre estas atividades, o transporte é uma prática indispensável nas piscigranjas (Kubtiza, 1999; Urbinati *et al*., 2004; Inoue, 2005), envolvendo procedimentos de captura, confinamento, manuseio e adensamento (Kubtiza, 1999; Gomes *et al*., 2006; Brandão *et al*., 2006), processos estes que são traumáticos e estressantes e geram consequências negativas para a saúde dos peixes (Iwana *et al*., 2004; Urbinati *et al*., 2004; Oliveira, 2008; Nunes, 2010).

Com a industrialização da aquicultura, o uso de novos produtos tem sido uma alternativa importante para manter o bem estar e a sobreviência dos peixes nas etapas do transporte (Treves-Brown, 2000; Inoue *et al.*, 2010; Nunes, 2010). Um produto que vêm sendo bastante utilizado, principalmente como medida profilática, é a administração de imunoestimulantes antes da exposição do animal a procedimentos estressantes (Jeney *et al*. 1997; Cecarelli *et al.*, 2000; Abreu, 2007; Carneiro *et al*., 2009; Siwicki *et al*., 2009; Chagas, 2010).

A utilização de imunoestimulantes promove uma maior eficiência da resposta imune contra infecções causadas por agentes patogênicos, a partir da elevação dos níveis de lisozima e estimulação da atividade fagocitária dos macrofágos, além de minimizar o efeito imunossupressivo do estresse (Anderson e Jeney, 1992; Oliveira, 2008; Abreu *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Siwicki *et al.*, 2009; Nayak, 2010). Dentre os imunoestimulantes utilizados na aquicultura, além das vitaminas C e E, destacam-se o levamisol e o glicano (Palic *et al*., 2006; Sado, 2008), que vêm sendo estudados e testados em diversas espécies de peixes para aumentar as respostas imunes não específicas (Gopalakannan e Venkatesan, 2006; Oliveira, 2008; Nayak, 2010) e aumentar a resistência contra patógenos (Kajita *et al*., 1990; Misra *et al.*, 2006; Bendach *et al.*, 2009), demonstrando resultados positivos em diversas espécies de peixes (Wittington *et al.*, 2005; Oliveira, 2008; Wang *et al.*, 2008; Siwicki *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Chagas, 2010; Sang e Fotedar, 2010).

Apesar dos resultados positivos com a utilização dos imunoestimulantes na aquicultura, pesquisas com tambaqui ainda são insuficientes, tendo em vista que esta espécie é a terceira mais cultivada na piscicultura brasileira, com cerca de 46.450 toneladas no ano de 2009, e a primeira na região Norte, com cerca de 35.782 toneladas (Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA, 2010). Esses resultados é uma consequência das inúmeras pesquisas que têm gerado tecnologias adequadas para a criação da espécie, além das suas características

biológicas (Araújo-Lima e Goulding, 1997; Brandão *et al.*, 2004; Gomes *et al*., 2006; Chagas *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2009). Com o objetivo de contribuir com os avanços das pesquisas sobre o manejo de tambaqui, este estudo avaliou os efeitos de dois imunoestimulantes, levamisol e glicano, como profiláticos para esta espécie, criada em sistema de tanques-rede, e como mitigador do estresse causado durante e após o transporte dos peixes.

2. MATERIAL E METÓDOS

2.1 Obtenção e aclimatação dos peixes

Os peixes foram obtidos na Piscicultura Santo Antonio, localizada na rodovia AM 010, Km 112, município de Rio Preto da Eva, AM. e transferidos para a Estação Experimental de Piscicultura da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura – CPAQ do INPA, onde foram mantidos em viveiros escavados de 150 m². Estes peixes foram alimentados com ração extrusada contendo 36% de proteina bruta (PB) até atingir o peso de 16,3 ± 4,6 gramas.

2.2. Preparo das dietas experimentais

Os imunoestimulantes glicano e levamisol foram suplementados em ração comercial com 36% PB, nas concentrações de 5 e 250 $mg.kg^{-1}$ de ração, respectivamente, valores estes baseados nos experimentos obtidos no capítulo III desta tese. A ração foi triturada e suplementada com os imunoestimulantes, previamente dissolvidos em 350 mL de água, que, após a homogeneização, foi peletizada e submetida ao processo de secagem em estufa a 55ºC, por 24 horas. A ração do tratamento controle foi preparada de maneira similar, entretanto, sem a suplementação dos imunoestimulantes. O glicano utilizado foi fornecido pela Biorigin® (São Paulo, Brasil) e o levamisol pela Vetbrands® (São Paulo, Brasil).

2.3. Desenho experimental

2.3.1. Criação em tanques-rede

Após biometria inicial (16,3 ± 4,6 g e 8,12 ± 0,85 cm), os peixes foram separados em 9 grupos de 40 animais para os três tratamentos: TR1= controle (somente ração comercial); TR2= ração comercial + 5 mg glicano.kg^{-1} ração e TR3= ração comercial + 250 mg levamisol.kg^{-1} ração.

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, até a saciedade aparente, às 9:00 e 16:00 h. Cada tratamento foi constituído por três réplicas. Os peixes foram mantidos em tanques-rede de 1 m^3 dispostos num viveiro de 150 m^2, por um período de 60 dias. Ao final deste período, os peixes ficaram 24 h em jejum e, posteriormente, foram feitas biometria de todos os peixes e coleta de sangue de seis peixes de cada unidade experimental. As amostras de sangue foram utilizadas para as análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas.

2.3.2. Avaliação dos imunoestimulantes como mitigador do estresse do transporte

Após 24 h de jejum, para o esvaziamento do trato gastrointestinal, 28 peixes, de cada tratamento e suas réplicas (ítem 2.3.1), foram acondicionados em sacolas plásticas supridas com 20 L de água, 80 L de O_2 puro e 0,3% de NaCl, em uma densidade de estocagem de aproximandamente 80 g.L^{-1}, seguindo as recomendações de Urbinati *et al.*, (2004). Em seguida, as sacolas foram lacradas, dispostas em caixas de isopor e transportadas em veículo por um período de 6 h.

Imediatamente após o transporte, foram coletadas amostras de sangue de seis peixes por réplica. Sendo que o restante dos animais foram transferidos para tanques de PVC de 500 L com fluxo de água contínuo para avaliação da recuperação dos mesmos, sendo coletadas amostras de sangue de seis peixes por réplica nos intervalos de 24, 48 e 96 h após o transporte.

2.4. Monitoramento da qualidade da água

Foram feitas análises físicas e químicas da água (temperatura, O_2, condutividade elétrica, pH, amônia, nitrito, alcalinidade, dureza e CO_2) do viveiro com os tanques-rede (durante 60 dias), das sacolas de transporte (imediatamente após o transporte) e dos tanques de recuperação (durante 96 h).

As concentrações de oxigênio dissolvido e os valores da temperatura, condutividade elétrica e pH foram medidos diariamente às 9:00 h, enquanto que as análises de amônia, nitrito, alcalinidade, dureza e CO_2 foram realizadas semanalmente. O oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica e pH foram determinados utilizando um medidor multiparamétrico digital da marca YSI (Yellow Spring Instrument). A concentração de amônia total (NH_3 + NH_4^+) foi determinada pelo método colorimétrico segundo Verdouw *et al*. (1978) e a concentração de nitrito (NO_2) pelo método colorimétrico de Boyd e Tucker (1992). A alcalinidade, dureza e CO_2 determinadas por meio de titulação segundo Boyd e Tucker (1992).

2.5. Índices zootécnicos

O cálculo do desempenho dos juvenis de tambaqui foi realizado a partir das avaliações biométricas realizadas no início e ao final de 60 dias de criação no tanque-rede. Com os dados biométricos, foram calculados:

Consumo Diário de Ração (CDR) = 100x[(quantidade de ração (g) /biomassa de peixe (g))/dias]. **Ganho de peso (GP)** = Pf – Pi. Onde: Gp = ganho de peso; Pf = peso médio final (g); Pi = peso médio inicial (g); **Conversão alimentar aparente (CAA)** = conversão alimentar aparente; RC = ração consumida (g); GP = ganho de peso (g); **Taxa de crescimento específico** (TCE) = 100* [(ln Pf – ln Pi)/t]. Onde: Pf = Peso final (g); Pi = Peso

inicial; In: Logaritmo natural; t = dias de experimento; **Fator de Condição (FC**)= Pf/Cf^3 x 100, onde Pf = peso final e Cf^3 = cubo do comprimento final; **Coeficiente de Variação do Comprimento** (CV) = (desvio padrão do comprimento/comprimento médio) x 100; Ao final do experimento foram avaliados os parâmetros de produtividade final: sobrevivência (%) e produção por área (peixes/m^2).

2.6. Coleta e análises de sangue

Em todas as amostragens, o sangue foi coletado por meio da punção caudal utilizando seringas com EDTA 10% e destinado à determinação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos descritos resumidamente a seguir e em detalhes no capítulo III desta tese.

As determinações de hematócrito (Ht), número de eritrócitos (RBC) e hemoglobina (Hb) foram feitas utilizando métodos preconizados na literatura. O volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculadas a partir dos valores brutos de Ht, Hb e RBC. A contagem dos leucócitos totais (WBC) e trombócitos foi feita em extensões sanguíneas segundo Tavares-Dias *et al.* (2002), após serem previamente coradas pelo método de coloração rápida May Grunwald-Giemsa Wright (MGGW), segundo Tavares-Dias e Moraes (2003). Após a centrifugação do sangue, o plasma foi utilizado para a determinação da glicose pelo método enzimático-colorimétrico utilizando kit comercial (Doles®).

As concentrações dos íons plasmáticos Na^+, K^+, Ca^{2+} foram determinadas utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica da marca Perclin Elmer (AAS), modelo 1100B. O íon Cl^- foi determinado pelo método colorimétrico utilizando kit comercial (Doles®). As amostras foram lidas em espectrofotômetro da marca Bioplus 2000.

O cortisol foi determinado pelo método de ELISA, com auxílio do kit Enzyme Immunoassay Correlate-EIA Cortisol®, utilizando espectofotômetro de placa (marca Spectramax plus 384). Os resultados foram calculados por meio de uma curva padrão em ng/µL.

A concentração e a atividade de lisozima foram realizadas segundo Ellis (1990) e Marzochi-Machado *et al*. (1999) e modificações descritas por Abreu (2007). Foi feita uma curva padrão utilizando lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha (1mg mL^{-1}) nas concentrações 10, 25, 50, 80, 100 e 150 ng lisozima/300 µL da suspensão de *Micrococus lysodeikticus* (10 mg) e 50 mL de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH= 6,2) e lida em espectofotômetro de placa Spectramaxplus 384, sendo o resultado da diferença de densidade óptica inicial e final utilizado para a quantificação das concentrações de lisozima nas amostras na curva padrão.

2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA). As variáveis que apresentaram efeitos significativos nos tratamentos foram submetidas ao teste de comparação de média de Tukey. Como pré-requisitos para a realização da análise de variância, foram avaliadas as premissas de normalidade e homogeneidade. Ambas as análises foram realizadas ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Qualidade da água

Os valores das variáveis físicas e químicas da água das diferentes fases experimentais estão representados nas Tabelas 1, 2 e 3. A água do viveiro (Tabela 1) apresentou baixa variação no período de 60 dias, apresentando valores dentro da área de conforto para peixes

tropicais (Kubitza, 2003). As variáveis físicas e químicas da água, após 6 h de transporte, apresentaram alterações significativas em comparação à água utilizada no início do transporte (Tabela 2). Independente da dieta, foi observado um aumento significativo nos valores médios de temperatura, alcalinidade, CO_2, amônia total e tóxica e nitrito imediatamente após o transporte, enquanto que os níveis de oxigênio dissolvido, pH, dureza e condutividade permaneceram inalteráveis ao final do transporte. Durante o período de 96 h de recuperação após o transporte, não foram observadas alterações significativas na qualidade da água dos tanques experimentais entre os diferentes tratamentos (Tabela 3).

3.2. Índices zootécnicos

Os valores médios dos parâmetros zootécnicos dos peixes, após 60 dias alimentados com dietas com e sem suplementação de glicano e levamisol, são apresentados na Tabela 4. O peso inicial e o ganho de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais estão expostos na Figura 1. Nenhum dos parâmetros de desempenho produtivo analisados sofreram alterações significativas entre os tratamentos ao final da etapa nos tanques-rede.

3.3. Estresse fisiológico

A suplementação de glicano e levamisol na dieta não influenciou significativamente as respostas hematólogicas dos peixes ao final de 60 dias de cultivo nos tanques-rede e não ocasionou uma resposta diferenciada nos animais submetidos ao estresse de transporte, pois foi observado que, independente da dieta, os peixes apresentaram as mesmas variações nos parâmetros hematológicos entre as diferentes condições experimentais (início e término do transporte e durante 96 h de recuperação pós-transporte) (Figuras 2 a 5).

Avaliando os parâmetros do eritrograma dos peixes nas diferentes condições experimentais, é possível verificar que, com exceção da concentração de hemoglobina, que

apresentou valores significativamente menores, estes não foram alterados após 6 horas de transporte. Entretanto, em 24 h após o transporte, foi verificado que, com exceção do VCM, todos os parâmetros do eritrograma apresentaram um aumento significativo, sendo que a HCM retornou aos níveis iniciais (antes do transporte) após 48 h de recuperação (Figura 2E), enquanto que o Ht, Hb, RBC reduziram somente 96 h após o transporte (Figura 2A, B e C). A CHCM oscilou ao longo do período de recuperação, retornando aos valores iniciais após 48 h e aumentando novamente após 96 h (Figura 2F), por outro lado, o VCM reduziu após 24 h, permanecendo baixo após 96 h de recuperação (Figura 2D).

O número de trombócitos e leucócitos totais não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os diferentes tratamentos e nem ao longo das etapas do transporte e recuperação (Figura 3A e B). Entretanto, foi observada uma tendência de aumento na quantidade destas células nos peixes alimentados com dietas suplementadas com glicano e levamisol em comparação aos animais do tratamento controle, principalmente ao final de 60 dias de cultivo nos tanques-rede.

Em relação aos parâmetros bioquímicos plasmáticos, foi verificado que as concentrações de glicose e cortisol não foram influenciadas pela suplementação do glicano e levamisol na dieta. Entretanto, foi observado, em todos os tratamentos, um aumento significativo nos níveis de glicose e cortisol imediatamente após o transporte, sendo que estes valores retornaram aos níveis iniciais 24 h após o transporte (Figura 3C e D).

Os íons plasmáticos não sofreram influência das diferentes dietas experimentais, sendo observado efeito somente em função do transporte. Com excessão dos valores de cloreto, foi verificado que os animais apresentaram desequilíbrio osmorregulatório em função do estresse causado pelo transporte. Os níveis de sódio e potássio plasmático oscilaram ao longo do período de recuperação, não retornando aos valores iniciais após 96 h (Figura 4A e B), enquanto que os níveis de cálcio plasmático aumentaram 24 h após o transporte,

permanecendo elevado após 96 h (Figura 4C). Por outro lado, os níveis de cloreto plasmático não apresentaram variação significativa ao longo do transporte e do período de recuperação (Figura 4D).

A concentração e a atividade da lisozima, não alteraram em função dos tratamentos, sofrendo influência apenas ao longo do transporte, onde foi observado um aumento significativo imediatamente após o transporte, em todos os tratamentos, retornando aos valores iniciais após 24 h de recuperação (Figura 5A e B).

4. DISCUSSÃO

4.1. Qualidade da água

A qualidade da água dos viveiros em sistemas intensivos de criação é um fator fundamental para o estado de saúde dos peixes e, consequentemente, para a produtividade da piscicultura (Kubitza, 2003; Colt, 2006; Li *et al.*, 2009). Portanto, monitorar os principais parâmetros físicos e químicos da água nos sistemas de produção deve ser uma prática comum das pisciculturas (Kubitza, 2003; Ono e Kubitza, 2003; Ono, 2005). No presente trabalho, as variáveis de qualidade da água avaliadas nos viveiros com tanques-rede permaneceram dentro dos limites recomendados para criação de peixes tropicais e para tambaqui (Tabela 1) (Sipaúba-Tavares, 1995; Kubitza, 2003). De acordo com a literatura, a faixa de conforto térmico para o consumo de alimento para tambaqui oscila entre 27 a 30^{o}C (Kubitza *et al.*, 2004), entretanto esta espécie pode suportar temperaturas de 24 a 35^{o}C (Araújo-Lima e Golding, 1997). De acordo com Saint-Paul (1984) e Almeida-Val *et al*. (1993), o tambaqui mostra sinais típicos de asfixia com 2 mg O_2 dissolvido.L^{-1}, entretanto, pode sobreviver horas em águas com 0,5 mg O_2 dissolvido.L^{-1}. Os limites de tolerância dessa espécie ao pH da água é de 4 a 8 (Aride *et al*., 2007), sendo resistentes à concentrações de amônia total de até 5

mg.L^{-1} (Parma-de-Croux *et al.*, 1994), amônia tóxica até 0,71 mg.L^{-1} (Marcon *et al.*, 2004) e nitrito até 0,4 mg.L^{-1} (Costa *et al*., 2004).

Estas informações são importantes para o manejo da espécie em sistemas de cultivo, assim como para os procedimentos das práticas de transporte de peixes vivos (Kubitza, 1999; Oliveira, 2008). Os resultados da temperatura da água de transporte de juvenis de tambaqui, em todos os tratamentos, demonstraram valores elevados, entretanto, suportáveis pela espécie. Isso pode ser justificado pelo aumento da temperatura ambiental, no período da tarde, e pelas condições de transporte dos peixes em sacolas plásticos e veículo aberto, semelhante ao descrito por Inoue (2005), Oliveira (2008) e Inoue *et al.* (2010).

Embora os valores de amônia total (NH_3+NH_4^+) estejam acima dos recomendados para o transporte de peixes tropicais, segundo Kubitza (1999), estas estão abaixo dos valores máximos tolerados pela espécie. Além disso, as concentrações de amônia não ionizada (NH_3), a forma mais tóxica da amônia, estiveram abaixo dos valores considerados críticos para tambaqui e dos recomendos por Kubtiza (1997) que é de 0,01 mg NH_3.L^{-1}. O aumento nos níveis de amônia durante o transporte de peixes é bem documentado na literatura (Wilson *et al.*, 1994; Carneiro e Urbinati, 2001; Ono e Kubitza, 2003; Oliveira, 2008; Inoue *et al.* 2010). Isto ocorre, principalmente, devido a eliminação de compostos nitrogenados nas fezes e urina dos peixes na água, mesmo após o jejum de 24 a 48 h, e ao aumento da taxa metabólica dos peixes sob estresse de confinamento, causando um desequilíbrio homeostático, com alterações osmorregulatórias, hematológicas, bioquímicas, imunológicas (Wright e Land, 1998; Paterson *et al.*, 2003).

Em ambientes aquáticos continentais, o pH e a temperatura da água são os principais fatores que interferem na curva da amônia total, onde valores de pH mais alcalinos e temperaturas mais elevadas aumentam a produção de amônia não ionizada (Kubitza, 2003). Portanto, embora em temperaturas elevadas, os valores de pH (6,5 a 6,6), obtidos neste

estudo, contribuíram para os baixos níveis de NH_3 nas sacolas de transporte de tambaqui após 6 horas.

4.2. Índices zootécnicos

A sobrevivência de 100% dos peixes, desde a criação em tanques-rede até o período de recuperação ao estresse de transporte (96 h) indica um manejo adequado para a espécie nestas diferentes etapas experimentais.

Em sistemas de criação intensiva e super-intensiva (ex. tanques-rede), a melhoria no desempenho dos peixes tem sido o foco principal da atividade aquícola (Kubitza, 2004). Entretanto, os animais são expostos continuamente a alterações na qualidade da água e a práticas de manejo, tais como: manuseio excessivo, transporte e adensamento, que podem causar consequências negativas sobre o desempenho produtivo, resposta imune e resistência dos peixes a doenças (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002; Brandão *et al.*, 2006; Chagas, 2010). Nesse sentido, várias produtos vêm sendo testados para avaliar sua eficácia como mitigadores de estresse, entre eles: cloreto de sódio (Gomes *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2006), sulfato de cálcio (Bendhack e Urbinati, 2009; Nunes, 2010), anestésicos (Urbinati e Carneiro, 2001; Inoue *et al.*, 2010) e imunoestimulantes (Sakai, 1999; Menezes *et al.*, 2006; Misra *et al.*, 2006a,b; Affonso *et al.*, 2007; Ai *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2007; Oliveira, 2008, Chagas, 2010).

Estudos descritos na literatura têm demonstrado que a suplementação de imunoestimulantes na dieta, tem ocasionado uma melhora no desempenho produtivo de várias espécies, como os resultados descritos por Ai *et al*. (2007), que observaram uma taxa de crescimento específico significativamente maior em "yellow croaker" *Pseudosciaena crocea* alimentados com dietas suplementadas com 0,09% de glicano. Li *et al.* (2006) obtiveram uma melhora no ganho de peso do robalo híbrido, *Dicentrarchus labrax,* utillizando dietas

contendo 100 e 250 mg de levamisol.kg^{-1} na ração. Schorer (2008) observou que pacus (*P. mesopotamicus*) alimentados com ração suplementada com 0,3% de β-glicano apresentaram melhor ganho de peso, taxa de crescimento específico e peso final.

No presente estudo, não foi observada influência da suplementação de glicano e levamisol sobre o desempenho produtivo dos tambaquis, fornecendo indícios que estes imunoestimulantes, nas concentrações utilizadas, não foram eficazes para aumentar a produtividade desta espécie. Resultados semelhantes foram obtidos por Leano *et al*. (2004), estudando juvenis de cobia, *Rachycentron canadum*, alimentados com dietas suplementadas com 500 e 1000 mg levamisol.kg^{-1} ração, durante 15 dias, onde não observaram maior ganho de peso destes peixes em relação àqueles do controle (dieta sem inumoestimulante). Da mesma forma, Oliveira (2008) não detectou diferenças nos índices de desempenho de juvenis de matrinxã, *B. amazonicus*, utilizando suplementação de 100, 200, 300, 400, 500 mg levamisol.kg^{-1}. Juvenis de pacu, *P. mesopotamicus*, suplementados com várias concentrações de levamisol (50, 100, 200, 400, 800 mg.kg^{-1}) (Sado, 2008) e glicano (10, 50, 100 µg glicano 100 g.peso^{-1}) (Abreu, 2007) também não apresentaram um incremento no desempenho produtivo quando comparados aos animais do tratamento controle. Chagas (2010) observou que a suplementação de diferentes concentrações de glicano na dieta do tambaqui não influenciou no desempenho produtivo, entretanto apresentou uma tendência de melhora no ganho de peso e conversão alimentar da espécie.

Contrariamente, vários autores descrevem a eficácia destes produtos na criação de peixe. Ai *et al*. (2007), testando níveis de glicano na dieta de "yellow croaker" *Pseudosciaena crocea*, observaram uma taxa de crescimento específico significativamente maior nos peixes alimentados com dietas suplementadas com 0,09% de glicano em comparação com o tratamento controle. Li *et al*. (2006) obtiveram melhora no ganho de peso do robalo híbrido (*Dicentrarchus labrax*) utillizando dietas contendo 100 e 250 mg de levamisol.kg^{-1} na ração,

por três semanas, quando comparadas ao controle. Schorer (2008) observou que pacus (*Piractus mesopotamicus*) alimentados com ração suplementada com 0,3% de β-glicano apresentaram melhor ganho de peso, taxa de crescimento específico e peso final em relação às diferentes concentrações de glicano e o grupo controle.

O sistema de criação em tanque-rede tem apresentado ótimos resultados para o tambaqui na fase de recria, com produção de aproximadamente 200 peixes/m^3, produtividade superior em comparação ao cultivo em viveiros escavados (Melo *et al.*, 2001) e tanques (Souza *et al.*, 1998) que foram 7,5 e 20 peixes/m^2, respectivamente, pois, de acordo com Beveridge (1996) tanques de menor volume trocam de água mais rapidamente que tanques de maior volume, apresentando, desta forma, maior produtividade. Na etapa de engorda, Chagas *et al.* (2007) observou que, após 120 dias de criação em tanque-rede, os tambaquis, com peso inicial de 200 g, mantidos na densidade de 15 peixes/m^3 apresentaram uma produção de 10 kg/m^3. Neste estudo, os tambaquis, com peso inicial de 20 g, mantidos em tanques-rede numa densidade de 40 peixes/m^3 durante 60 dias, apresentaram uma produção de 2,8 kg/m^3. Com base nas informações da literatura, podemos concluir que os resultados de desempenho zootécnico do tambaqui no presente estudo foram satisfatórios para a espécie nesta fase da criação, demonstrando o potencial desse sistema de criação.

4.3. Estresse fisiológico

Vários trabalhos na literatura têm utilizado os parâmetros do eritrograma para avaliar a eficácia de diferentes imunoestimulantes como mitigadores de estresse. Falcon (2007) testou o efeito da suplementação de vitamina C e glicano na dieta de tilápia do nilo, *O. niloticus*, como mitigador de estresse de transporte e observou que os os parâmetros hematológicos não sofreram influência dos imunoestimulantes, variando em todos os tratamentos após o transporte. Abreu (2007) não observou efeito da suplementação de glicano sobre as respostas

hematológicas de pacu, *P. mesopotamicus,* e nem na mitigação do estresse de captura. Da mesma forma, Oliveira (2008) não detectou diferenças significativas na hematologia de matrinxãs submetidos ao estresse de transporte por 5 h, após alimentação com dieta contendo 100 mg levamisol.kg^{-1} por 30 dias. Esses estudos também são corroborados por Chagas (2010) que não observou diferenças fisiológicas nos tambaquis alimentados com 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 % de glicano kg^{-1} sob efeito do estresse de transporte. De maneira similar a esses trabalhos, neste estudo, a suplementação de glicano e levamisol não influenciou as alterações do eritrograma observadas nos tambaquis após o estresse de transporte, sendo estas uma resposta ao estresse.

Em relação ao transporte, foi obervada uma redução significativa da concentração de hemoglobina imediatamente após o transporte. Este resultado pode estar relacionado com uma provável lise das células sanguíneas em função do estresse (Wendelaar Bonga, 1997), fato este reforçado pela tendência na redução no número de eritrócitos e aumento significativo do potássio plasmático, visto que este é o principal cátion intracelular (Baldisserotto, 2002). Uma análise mais integrada dos parâmetros do eritrograma do presente estudo indicam que, a redução na capacidade de transporte de oxigênio, em função da redução da hemoglobina, estimulou a liberação das células sanguíneas, principalmente pelo baço e rim cefálico, que são os principais órgãos hematopoiéticos dos peixes teleósteos (Tavares-Dias e Moraes, 2004), resultando em um aumento significativo no número de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, HCM e CHCM após 24 h de recuperação e, consequentemente, uma redução no VCM, visto que as células novas possuem um menor tamanho (Ranzani-Paiva *et al.*, 2004; Tavares-Dias e Moraes, 2004). Neste trabalho, os parâmetros do eritrograma apresentaram alterações típicas de estresse fisiológico em peixes teleósteos (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Tavares-Dias e Moraes, 2004; Affonso *et al.*, 2007; Bendach e Urbinati, 2009).

O acompanhamento do trombograma e leucograma é igualmente importante para a avaliação do estado de saúde dos animais, fornecendo informações relevantes sobre seu sistema imunológico (Ranzani-Paiva *et al.*, 2004; Tavares-Dias e Moraes, 2004). Os leucócitos são os principais componentes do sistema imune dos peixes, sendo produzidos, principalmente, no rim cefálico, timo e baço (Tort *et al*., 2003). De forma complementar aos leucócitos, os trombócitos também podem participar da defesa imune dos peixes, pois além da função de hemostasia, existem relatos na literatura demonstrando que estas células possuem um potencial fagocítico (Tavares-Dias e Moraes, 2004; Tavares-Dias *et al.*, 2007; Tavares-Dias e Oliveira, 2009).

Neste estudo, o número de leucócitos e trombócitos não variou em função da suplementação de levamisol e glicano na dieta, bem como entre as etapas do transporte. Embora sem diferenças significativas, é possível observar uma tendência de aumento nos valores de leucócitos e trombócitos de tambaquis alimentados com glicano e levamisol em todas as etapas do estudo, sendo 5 mg glicano.kg^{-1} os valores mais elevados. Observa-se, ainda, uma tendência na diminuição, principalmente nos leucócitos, imeditamente após o transporte, sendo mais evidente em 24 h de recuperação, com posterior elevação dos valores. Menezes *et al*. (2006) também não encontraram efeito da suplementação de superdoses de vitamina C e E na ração sobre a produção dessas células para pirarucu. Segundo Oliveira (2008), matrinxã suplementada com levamisol na ração apresentou efeito negativo sobre a quantidade de leucócitos totais imediatamente após o transporte, enquanto que os trombócitos não foram influenciados pela dieta, sofrendo uma redução significativa após o transporte em todos os tratamentos. Segundo o autor, essa redução no leucograma ocorreu em função da elevação de cortisol plasmático que, de acordo com Weys *et al.* (1998) e Benfey e Biron (2000), age alterando o número e afinidade de receptores específicos nos leucócitos sanguíneos, causando um quadro de leucopenia nos animais.

O cortisol é o indicador primário mais utilizado para a caracterização do estresse fisiológico em peixes (Barton e Iwama, 1991; Gomes *et al.*, 2003; 2006; Acerete *et al.*, 2004; Urbinati *et al.*, 2004; Urbinati e Carneiro, 2006; Abreu, 2007; Oliveira, 2008; Chagas, 2010; Inoue *et al.,* 2010). Este homônio combina funções mineralocorticóides e glicocorticóides (Wendelaar Bonga, 1997), além de participar da regulação do equilíbrio hidromineral e do metabolismo energético, da redução da taxa de crescimento, supressão da função reprodutiva e do sistema imune dos animais (Wendelaar Bonga, 1997).

Os valores elevados nos níveis de cortisol plasmático em juvenis de tambaquis, após 6 horas transporte, demonstram o efeito deste hormônio como resposta ao estresse causado por esta prática de manejo; valores estes que retornaram aos níveis iniciais (pré-transporte) após 24 h de recuperação. Os resultados obtidos são corroborados por Carneiro e Urbinati (2001) que observou aumento significativo nos níveis de cortisol após o transporte de matrinxã, os quais retornaram aos valores iniciais algumas horas após esta prática. Resultados similares foram observados para salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e truta arco-íris (*O. mykiss*) submetidos ao estresse do transporte, entretanto, os níveis de cortisol retornaram aos valores iniciais somente após alguns dias (Barton *et al*., 1980; Iversen *et al*., 1998). Oliveira (2008) observou diferenças significativas nos níveis de cortisol de matrinxã, independente dos tratamentos com e sem levamisol, após o transporte, assim como Inoue *et al.* (2010), após o transporte de matrinxã, utilizando diferentes concentrações do anestésico benzocaína e Nunes (2010) após transportedesta mesma espécie com diferentes concentrações de sal e gesso.

Apesar da elevação dos níveis de cortisol, a suplementação com glicano e levamisol não apresentou efeito mitigador do estresse para o tambaqui. Resultados semelhantes foram obtidos por Chagas (2010), trabalhando com diferentes concentrações de glicano suplementados na dieta de juvenis de tambaqui submetidos ao estresse de transporte e Abreu

(2007) com pacus alimentados com diferentes concentrações de glicano e submetidos ao estresse de captura.

O aumento da liberação de cortisol na corrente sanguínea induz as respostas secundárias do estresse como a hiperglicemia, que é a principal fonte de energia utilizada pelos peixes em situações desfavoráveis (Urbinati e Carneiro, 2004; Mommsen *et al.*, 1999; Iwama *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2006; Affonso *et al.*, 2007; Carneiro *et al.*, 2009; Chagas, 2010; Nunes, 2010). Sob situações de estresse, os peixes utilizam suas reservas hepáticas de glicogênio, por meio da glicogenólise, disponibilizando maior quantidade de energia para o organismo fugir ou se adaptar às novas condições ambientais (Iwama *et al*., 2004, Inoue, 2005).

Neste estudo, os tambaquis criados por 60 dias em tanques-rede, independente do tratamento, não apresentaram diferenças significativas nos níveis de glicose plasmática, sugerindo a eficiência do manejo (alimentação e nutrição, densidade de estocagem, qualidade da água, entre outros) realizado durante a criação. De maneira similar, Menezes *et al.* (2006), Affonso *et al.* (2007) e Andrade *et al.* (2007) verificaram que a adição de vitamina C e E também mantiveram a homeostase fisiológica de juvenis de matrinxã e pirarucu criados em viveiros escavados e tanques-rede.

Em relação ao transporte, foi obsevado que, independente do tratamento, houve hiperglicemia em todos os peixes submetidos ao estresse do transporte, retornando aos valores iniciais após 96 h de transporte, indicando que a recuperação foi completa, e o gasto energético dos peixes promovidos para suportar as situações de estresse foram recuperados. Os resultados demonstram que a suplementação da ração com imunestimulantes não foi eficaz na mitigação do estresse causado pelo transporte (Figura 3C). De forma semelhante, Chagas (2010) também observou hiperglicemia em tambaqui imediatamente após o transporte, verificando que a adição de glicano e nucleotídeos não mitigou as respostas de estresse.

Corroborando com esses resultados, Oliveira (2008) verificou que a suplementação de levamisol na ração não impediu a hiperglicemia em matrinxã 24 e 48 h após o transporte. Por outro lado, Ortuño *et al.* (2003) e Okamura *et al.* (2007) verificaram que a adição de vitamina C na dieta manteve os níveis glicêmicos estáveis durante a indução de estresse em "gilthead seabream" (*Spaurus aurata*) e tilápia-do-nilo, respectivamente. Jeney *et al.* (1997) também observaram que, em truta arco-íris, a adição de 1% de glicano na ração resultou na estabilização dos níveis glicêmicos após o estresse de transporte. Após 24 horas de recuperação pós-transporte, os níveis plasmáticos de glicose em juvenis de tambaquis retornam aos valores iniciais (antes do transporte).

Outros efeitos secundários observados em peixes em resposta ao estresse são as alterações hidroeletrolíticas, que podem causar o aumento da mortalidade nos peixes após o transporte (Kubtiza, 1997; Mommsen *et al*., 1999; Inoue *et al*,. 2010). Em geral, os estressores afetam o balanço hidromineral em peixes (Iwana *et al*., 2004) diretamente ou devido ao aumento das catecolaminas circulantes que aumentam a permeabilidade das brânquias aos íons e à água (Mcdonald e Milligan, 1997; Wendelaar Bonga, 1997).

O K^+ é o principal cátion intracelular e pequenas mudanças em sua concentração, pode alterar drasticamente o funcionamento do organismo. Em um animal não estressado, cerca de 98% do K^+ encontra-se no interior das células, principalmente devido a bomba de Na^+/K^+ que matém o potássio nas células. O Na^+ é o cátion mais abundante no meio extracelular e influencia o grau de retenção de água corporal. Os processos que tendem a aumentar ou diminuir os íons Na^+ tendem, respectivamente, a aumentar e diminuir os íons Cl^- e, quando isso ocorre, há o desequilíbrio eletrolítico. O Cl^- é um ânion importante que participa na manutenção do balanço de fluídos e eletrólitos, pois, geralmente, também segue as alterações do íon bicarbonato, principalmente nas trocas de cloreto pelas hemoglobinas (Sakuragui, 2006). O Ca^{2+} é um cátion essencial para os processos fisiológicos dos peixes, como a

coagulação do sangue, formação dos ossos e escamas, contração muscular e outras reações (Kaneko e Hirano, 1993).

Neste estudo, as concentrações iônicas de Na^+, K^+, Ca^{2+} e Cl^- mantiveram-se praticamente constante ao longo dos 60 dias de experimento, resultados estes que corroboram com o trabalho de Tavares-Dias e Moraes (2010) para juvenis de tambaqui criados em viveiro escavado. Em relação ao transporte, foi observado que os níveis de Na^+ reduziram 24 h após o transporte nos animais do grupo controle e suplementados com glicano enquanto que nos animais suplementados com levamisol ocorreu uma elevação desse íon. Essa redução no Na^+ pode ser explicada pelo aumento da permeabilidade da membrana durante o estresse favorecendo a perda deste cátion para o meio externo hiposmótico (Mazeaud *et al*., 1977). Esses resultados foram corroborados por Takahashi *et al.* (2006) e Oliveira (2008) que também observaram desequilíbrios hidroeletrolíticos em pacu e matrinxã submetidos ao estresse do transporte.

Os níveis de K^+ do tambaqui do presente estudo aumentaram imediatamente após transporte e retornaram aos valores iniciais (antes do transporte) após 24 e 48 h de recuperação. Segundo Carneiro e Urbinati (2001), a elevação níveis desse cátion pode estar associado ao aumento da fragilidade das células sanguíneas durante o estresse, indicando um provável rompimento das membranas celulares. A elevação nos níveis plasmáticos de Ca^{2+}, 24 h após o transporte do tambaqui, neste estudo, pode ser um reflexo do aumento de cortisol plasmático imediatamente após o transporte, visto que este hormônio regula a absorção de cálcio, promovendo, à longo prazo, a hipercalcemia nos peixes em situações de estresse (Bendhack e Urbinati, 2009). Os resultados obtidos por Nunes (2010) corroboram com os do presente estudo, que observou uma tendência no aumento das concentrações de cálcio plasmático em juvenis de matrinxã após 48 h de transporte. Bendhack e Urbinati (2009)

também encontraram uma tendência de aumento nos níveis plasmáticos de cálcio do matrinxã 24 h após o transporte.

Vários trabalhos relatam o efeito do glicano sobre as respostas imunes não-específicas. Segundo Engstad *et al.* (1992), Jorgesen *et al*. (1993) e Shorer (2008), o glicano aumentou significativamente a atividade de lisozima em salmão do atlântico (*S. salar*), truta arco-íris (*O. mykiss*) e pacu (*P. mesopotamicus*) respectivamente. Siwicki *et al.* (2009) observaram aumento significativo na atividade de lisozima em *Sander lucioperca* após alimentação com glicano. Entretanto, para tilápia do nilo (*O. niloticus*) não foi observado aumento na atividade de lisozima, após alimentação suplementada com 50, 100 e 200 mg glicano.kg^{-1} (Whittington *et al*., 2005). Abreu (2007) e Shorer (2008) não observaram aumento da concentração e atividade de lisozima em pacu (*P. mesopotamicus*), alimentados com dietas suplementadas com glicano e submetidos ao estresse de captura e transporte. Da mesma forma, Chagas (2010) não observou aumento nas concentração e na atividade de lisozima em tambaquis alimentados com 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8% de glicano.kg^{-1} e submetidos ao estresse de transporte. Li *et al.* (2006) observou um aumento nas concentações de lizosima em *Clarias fucus* suplementadas com 75, 150, 300 e 600 mg levamisol.kg^{-1} durante 7 dias. Gopalakannan e Arul (2006), observaram um aumento na atividade de lizosima em carpa comum, *C. carpio*, após 30, 60 e 90 dias suplementadas com 250 mg levamisol.kg^{-1}. Maqsood *et al.* (2009) também observaram aumento na atividade de lizosima em carpa comum 57 e 70 dias após suplementação com 100, 250 e 500 mg levamisol.kg^{-1} ração.

No presente estudo, a concentração e a atividade de lisozima não foram alteradas pela suplementação de levamisol e glicano na dieta dos juvenis de tambaqui, entretanto, foi observado um aumento significativo na concentração e atividade de lisozima em todos os tratamentos imediatamente após o transporte. Resultados contrários foram descritos por Mock e Peters (1990) que observaram uma redução da concentração de lisozima em trutas arco-íris

após o transporte e exposição a poluentes. Caruso e Lazard (1999) também observaram uma diminuição da atividade de lisozima em tilápias expostas a altas densidades de estocagem. Segundo Biller (2008), a atividade dessa enzima sofre influência de fatores como estação do ano, sexo, estágio de maturação sexual, temperatura da água, estresse e poluição, podendo ser influenciada também pela condição de estresse a qual os peixes estão expostos (Yildiz, 2006).

Neste e em outros estudos, a suplementação de imunoestimulantes na ração para peixes não resultou em respostas positivas pelo animais submetidos ao estresse de transporte (Falcon, 2007; Oliveira, 2008; Chagas, 2010). A variação nos resultados relacionados à utilização de imunoestimulantes na piscicultura reforçam a necessidade de mais estudos sobre o efeito dessas substâncias sobre os organismos, pois estas respostas podem variar em função dos diferentes métodos de administração e ação de cada substância, bem como, idade e estado fisiológico dos peixes (Mulero *et al.*, 1998).

Com base nos resultados obtidos, é possível sugerir que os imunoestimulantes, levamisol e glicano, nas concentrações de 250 e 5 $mg.kg^{-1}$ respectivamente, não foram capazes de minimizar os efeitos adversos do estresse de transporte em juvenis de tambaqui. Entretanto, a espécie demonstra capacidade adaptativa para retornar a homeostase após o período de 24 horas de recuperação pós-transporte.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Temático de Solos e Plantas, ao Laboratório de Ecologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, à CAPES e FAPEAM pela bolsa concedida, e FAPEAM (Processo Nº 2106/2007) pelo financiamento da pesquisa

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, J.S. 2007. *Suplementação alimentar de pacu (Piaractus mesopotamicus Holmberg 1887) com β 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura*. Tese de Doutorado Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 123p.

Abreu, J.S; Marzocchi-Machado, C.M.; Urbaczek, A.C.; Fonseca, L.M.; Urbinati, E.C. 2009. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Brazilian Journal Biology*, 69(4): 1133-1139.

Acerete, L.; Balasch, J.C.; Espinosa, E.; Josa, A.; Tort, L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237: 167-178.

Affonso, E.G.; Silva, E.C.; Tavares-Dias, M.; Menezes, G.C.; Carvalho, C.S.M.; Nunes, E.S.S.; Ituassú, D.R.; Roubach, R; Ono, E.A.;. Fim, J.D.I.; Marcon. J.L. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comparative Biochememistry Physiology A*, 147: 383-385.

Ai, Q.; Mai; K.; Zhang, l.; Tan, B.; Zhang, W.; Xu, W.; Li, H. 2007. Effects of dietary β-1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*. 22: 394-402.

Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L.; Hochachka, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: status of an under-exploring biological "goldmine". In: Hochachka, P.W.; Lutz, P.L.; Sick, T.; Rosenthal, M.; Van den Thillart, G. (Eds). *Surviving Hypoxia: Mechanism of Control versus Adaptation*. CRC Press, Boca Raton, pp 435-445.

Anderson, D.P.; Jeney, G. 1992. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhances the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 34: 379-389.

Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Menezes, G.C.; Brasil, E.M.; Roubach, R.; Urbinati, E.C.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comparative Biochemistry Physiology A*, 146: 576-580.

Araújo-Lima, C.; Goulding, M. 1997. *So fruitful a fish: ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's tambaqui*. Columbia University Press, New York.

Aride, P.H.R.; Roubach, R.; Val, A.L. 2007. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquaculture Research*, 38: 588-594.

Baldisserotto, B. 2002. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: Ed. UFSM, 212p.

Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. 2005. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Ed. da UFSM – Santa Maria. 468p.

Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative Comparative Biology*, 42: 517-525.

Barton, B.A. e Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.

Barton, B.A.; Peter, R.E.; Paulencu, C.R. 1980. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest and subjected to handling, confinement, transport, and stocking. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 805–811.

Bendach, F.; Urbinati, E.C. 2009. Calcium sulphate as stress reducer in matrinxã (*Brycon amazonicus*) transportation. *Journal of Applied Ichthyology*. 25: 201-205.

Benfey, T.J., Biron, M. 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176.

Beveridge, M.C.M. 1996. *Cage aquaculture*. Fishing News Books, Oxford. 346p.

Biller, J.D. 2008. *Respostas fisio-patológicas e desafio por Aeromonas hydrophila em pacu alimentado com ração suplementada com β 1,3 glicano.* Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo. 114p.

Boyd, C.E.; Tucker, C.S. 1992. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn: Auburn University. 183p.

Brandão, F.R.; Gomes, L.C.; Chagas, E.C. 2006. Resposta de estresse em pirarucu, *Arapaima gigas*, durante prática de rotina de piscicultura. *Acta Amazonica*, 8: 349-356.

Brandão, F.R.; Gomes, L.C.; Chaga, E.C.; Araújo, L.D. 2004. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanque-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 357-362.

Brandão, F.R.; Gomes, L.C.; Chagas, E.C.; Araujo, L.D.; Silva, A.L.F. 2005. Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(3): 299-303.

Carmo, I.B.; Brasil, E.M.; Menezes, G.C.; Sobreira, C.B.; Santos, D.L.; Castro-Pérez, C.; Santos, M.Q.C.; Ono, E.A.; Affonso, E.G. 2010. *Efeito de altas doses de vitamina C sobre os parâmetros zootécnicos e fisiológicos do tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) criado em tanques-rede*. In: Aquabio, 2010, Recife Pernambuco-PE. IV Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2010.

Carneiro, P.C.F.; Kaiseler, P.H.F.; Swarofsky, E.A.C.; Baldisseroto, B. 2009. Transport of jundiá *Rhamdia quelem*, juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. *Neotropical Ichtyology*. 7: 283-288.

Carneiro, P.C.F.; Urbinati, E.C. 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. *Aquaculture Research*. 32: 297-3004.

Caruso, D.; Lazard, J. 1999. Subordination stress in Nile tilapia and its effect on plasma lysozyme activity. *Journal of Fish Biology*, 55: 451–454.

Carvalho, E.S.; Gomes, L.C. ; Brandão, F.R. ; Crescêncio, R. ; Chagas, E.C.; Anselmo, A.A.S. 2009. Uso do probiótico Efinol L durante o transporte de tambaqui (Colossoma macropomum). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61: 1322-1327.

Cavero, B.A.S., Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Ituassú, D.R.; Gandra, A.L.; Crescêncio, R. 2003. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu, em ambiente confinado. *Pesquisa agropecuária Brasileira*, 8(1):103-107.

Ceccarelli, P.S.; Senhorini, J.A.; Volpato, G. 2000. *Dicas em piscicultura: perguntas e respostas*. Botucatu: Santana gráfica editora. 247p.

Chagas, E.C. 2010. *β glucano e nucleotídeos para tambaquis (Colossoma macropomum) vacinados e desafiados com Aeromonas hydrophila: Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 141p.

Chagas, E.C.; Gomes, L.C.; Martins Junior, H.; Roubach, R. 2007 . Produtividade de tambaqui criado em tanque-rede com diferentes taxas de alimentação. *Ciência Rural*. 37: 25-35.

Chagas, E.C.; Lourenço, J.N.P.; Gomes, L.C.; Val, A.L. 2003. *Desempenho e estado de saúde de tambaquis cultivados em tanques-rede sob diferentes densidades de estocagem.* In: Urbinati, E.C. Possebon-Cyrino, J.E. (Ed) *Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura.*

Colt, J. 2006. Water quality requirements for reuse systems. *Aquacultural Enginnering*, 34: 143-156.

Costa, O.T.F.; Ferreira, D.J.S.; Mendonça, F.P.; Fernandes, M.N. 2004. Susceptibility of Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasaminae) to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, 232: 627-636.

Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assays. In: Stolen, J.S.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Roberson, B.S.; Muiswinkel, W.B. (Eds). *Techniques in fish Immunology*. USA: SOS publications, 101-103.

Engastad, R.E.; Robertsen, E.; Frivold, E. 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmo blood. *Fish & Shellfish Immunology*, 2: 287-297.

Falcon, D.R. 2007. *β glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parametros fisiopatológicos em juvenile de tilapia do nilo: nível de suplementação e tempo de administração*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. São Paulo. 146p.

Gomes, L.C.; Brandão, F.R.; Chagas, E.C.; Ferreira, M.F.B.; Lourenço, J.N.P. 2004. Efeito do volume do tanque-rede na produtividade do tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante a recria. 2004. *Acta Amazonica*. 34: 111-113.

Gomes, L.C.; Chagas, E.C.; Brinn, R. P.; Rooubach, R.; Coppati, E. C.; Baldisserotto, B. 2006. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture.* 256: 521-528.

Gomes, L.C.; Golombieski, J.I.; Chippari-Gomes, A.R.; Lopes, N.P.; Roubach, R.; Araujo-Lima, C.A.R.M.; Urbinati, E.C. 2003. Effect of fish density on the stress physiological responses and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum* during transportation. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34(1): 76-84.

Gopalakannan, A.; Arul, V. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255: 179-187.

Inoue, L.A.K.A. 2005. *Respostas do matrinxã (Brycon cephalus) a anestésicos e estressores*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 148p.

Inoue, L.A.K.A.; Hackberth, A.; Moraes, Gilberto. 2010. Benzocaína sobre respostas ao estresse do matrinxã submetido ao transporte em sacos plásticos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 11(3): 909-918.

Iversen, M.; Finstad, B.; Nilssen, K. 1998. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 168: 387-394.

Iwana, G.; Afonso, L.; Todghan, A.; Ackerman, P.; Nakaro, K. 2004. Are Hpsp suitable for indicationg stresse status in fish? *The Journal of Experimental Biology*, 20: 15-19.

Jeney, G.; Galeotti, M.; Volpatti, D.; Jeney, Z.; Anderson, D. P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*. 154(1):1-15.

Jorgesen, J.B.; Sharp, G.J.E.; Secombest, C.J., Robertsen, B. 1993. Effect of yeast cell wall glucan on the bactericidae activity of rainbow trout macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 3: 267-277.

Kajita,Y; Sakai, M; Atsuta, S; Kobayashi, M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout *O. mykiss*. *Fish Pathology*, 25: 93-98.

Kaneko, T.; Hirano, T. 1993. Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. *Journal Experimental Biology*, 184, 31–45.

Kim, Y.S.; Fei, K.; Zhang, Q.Y. 2009. Effect of β-glucan on activity of antioxidant enzymes and Mx gene expression in virus infected grass carp. *Fish & Shellfish Immunology*, 27:336-340.

Kubitza, F. 1997. Transporte de peixes vivos - Parte 1. *Panorama da Aqüicultura*, 7: 20-26.

Kubitza, F. 1999. *Técnicas de transporte de peixes vivos*. Degaspari. 3 ed. Jundiaí, 51p.

Kubtiza, F. 2003. *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. Jundiaí. 229p.

Kubitza, F.; Ono, E.A.; Lovshin, L.L.; Sampaio, A.V. 2004. *Planejamento da produção de peixes*. 4 ed. Jundiaí: F. Kubitza. 58p.

Leano, E.M.; Guo, J.J.; Chang, S.L.; Liao, I.C. 2004. Levamisole enhances non specific immune responses of cobia, *Ranchycention canadum*, fingerlings. *Journal of Fisheries Sociaty of Taiwan*, 30:321-330.

Li, G.; Guo, Y.; Zhao, D.; Qian, P.; Sun, J.; Xiao, C.; Liang, L.; Wang, H. 2006. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fuscus*. *Aquaculture*. 256: 212-217.

Li, N.; Wang, R.; Zhang, J.; Fu, Z.; Zhang, X. 2009. Developing a knowledge-based early warning system for fish disease/health via water quality management. *Expert Systems with Applications*, 36: 6500-6511.

Marcon, J. L.; Moreira, S. S.; Fim, J. D. I. 2004. *Median lethal concentration (LC50) for un-ionized ammonia in two Amazonian fish species, Colossoma macropomum and Astronotus ocellatus.* In: VI International Congress on the Biology of Fish. Manaus. 1:105-116.

Marzocchi-Machado, C.M.; Polizello, A.C.; Azollini, A.E.; Lucisano-Valin, Y.M. 1999. The influence of antibody functional of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. *Immunological Investigations*, 28: 89-101.

Masqood S., Samoon M. H., Singh B. 2009. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9: 111-120.

Mazeaud, M.M.; Mazeaud, F.; Donaldson, E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 201-212.

Mcdonald, D.G.; Milligan, C.L. 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama, G.K.; Pickering, A.D.; Sumpter, J.P.; Schereck, C.B. (ed.) *Fish stress and healt in aquaculture*. Cambridge. Cambridge University: 119-144.

Melo, L.A.S.; Izel, A.C.U.; Rodrigues, F.M. 2001. *Criação de tambaqui (Colossoma macropomum) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas*. Embrapa Amazônia Ocidental. 25p.

Menezes, G.C.; Tavares-Dias, M.; Ono, E.A.; Andrade, J.I.A.; Brasil, E.M.; Roubach, R.; Urbinati, E.C., Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E suplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 145(2): 274-279.

Menezes, G.C.; Tavares-Dias, M.; Ono, E.A.; Andrade, J.I.A.A.; Brasil, E.M.; Roubach, R.; Urbinati, E.C.; Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145: 274–279.

Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. 2010. *Produção Pesqueira e Aquícola: Estatistica 2008 e 2009*. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília.

Misra, C.K.; Das, B.K.; Mkherje, S.C.; Pattnai, K.P. 2006a. Effect of long term administration of dietary β-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*. 255: 82-94.

Misra, C.K.; Das, B.K.; Mkherje, S.C.; Pattnai, K.P. 2006b. Effect of multiple injections of β-glucan on non-specific immune response and disease resistence in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology*. 20: 305-319.

Mock, A.; Peters, G. 1990. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. *Journal of Fish Biology*, 37: 873–885.

Momnsen, T., Vijayan, M., Moon, T. 1999. Cortisol in teleost. dynamics, mechanism of action and metabolic regulation. *Reviews in fish Biology and Fisheries*, 9.211-268.

Mulero, V.; Esteban, M.A.; Munoz, J.; Meseguer, J. 1998. Dietary intake of levamisole enchances the immune rresponse and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*. 8: 49-62.

Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29: 2-14.

Nunes, E.S.S. 2010. *Efeito do sal (NaCl) e do gesso ($CaSO_4$) nas respostas metabólicas ao estresse do matrinxã, Brycon amazonicus, durante e após o transporte*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas.

Okamura, D.; Araújo, F.G.; Logato, P.V.R.; Murgas, L.D.S.; Freitas, R.T.F.; Araújo, R.V. 2007. Efeito da vitamina C sobre o hematócrito e glicemia de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em transporte simulado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(4): 883-888.

Oliveira, S.R. 2008. *Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse de transporte do matrinxã, Brycon amazonicus*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas.

Ono, E.A. 2005. Cultivar Peixes na Amazônia: Possibilidade ou Utopia? *Panorama da Aqüicultura*. 15:41- 48.

Ono, E.A.; Kubitza, F. 2003. *Cultivo de peixes em tanques-rede*. 3.ed. Jundiaí: E. Ono. 112p.

Ortuño, J.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 14: 145– 156.

Palic, D., Andreasen, C. B., Herolt, D. M., Menzel, B. W., Roth, J. A. 2006. Immunomodulatory effects of β-glucan on neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820) *Developmental & Comparative Immunology*. 30: 817-830.

Parma-de-Croux, M. J. 1994. Metabolic rate and oxygen consumption requirements of some fish species from the middle Parana river. *Acta Biology Venezuelana*. 5:1-10.

Paterson, B.D.; Rimmer, M.A.; Meikle, G.M.; Semmens, G.L. 2003. Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture*, 218: 717–728.

Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A. 2004. *Sanidade de Organismos Aquáticos.* São Paulo. 426p.

Sado, R. Y. 2008. *Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887)*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo –Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz. Piracicaba - SP. 136p.

Saint-Paul, U. 1984. Physicological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalmidae. *Environmental Biology of Fishes*, 11: 53-62.

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.

Sakuragui, M.M. 2006. *Resposta ao estresse osmotic e hipóxico em traíra, Hoplias malabaricus (Teleostei, Eurythrinedae) aspectos fisiológicos e adaptativos.* Tese de Doutorado. São Carlos. São Paulo. 102p.

Sang, H.M.; Fotedar, R. 2010. Effects of dietary β-1,3-glucan on the growth, survival, physiological and immune response of marron, Cherax tenuimanus (Smith, 1912). *Fish & Shellfish Immunogy*, 28:957-960.

Schorer, M. 2008. *Utilização do β-glucano sobre o desempenho produtivo, indicadores de estresse, perfil hematológico e sobrevivência do pacu, Piaractus mesopotamicus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo. 96p.

Sipaúba-Tavares, L.H. 1995. *Limnologia aplicada à aquicultura*. Jaboticabal: FUNEP, 1995.

Siwicki, A.K.; Zakes, Z.; Terech-Majewska, E.; Kowalaska, A.; Malaczewska, J. 2009. Supplementing the feed of pickeperch (*Sander lucioperca* (L) juveniles with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms. *Aquaculture Research*, 40: 405-411.

Souza, R.A.L.; Melo, J.S.C.; Pereira, J.A.; Peret, A.C. 1998. Determinação da densidade de estocagem de alevinos de tambaqui Colossoma macropomum Cuvier, 1818 (Pisces; Characidae) no Estado do Pará – Brasil. *Boletim Técnico do CEPTA*, 11: 39-48.

Takahashi, L.S.; Abreu, J.S.; Biller, J.D.; Urbinati, E.C. 2006. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, *Piaractus mesopotamicus*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 28: 469-475.

Tavares-Dias, M.; Melo, J.F.B.; Moraes, G.; Moraes, F.R. 2002. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do Jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*, 32(4): 693-698.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2003. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal*, 19: 103-110.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Villimpress. 143p.

Tavares-Dias, M.; Oliveira, S.R. 2009. A review of the blood coagulation system of fish. *Revista Brasileira de Biociências*, 7(2): 205-224.

Tavares-Dias, M.; Ono, E.A.; Pilarski, F.; Moraes, F.R.; 2007. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A citochemical study and ultrastructural analysis. *Journal of applied Ichthyology*. 23: 709-712.

Tavares-Dias, M; Moraes, F.R. 2010. Biochemical parameters for *Piaractus mesopotamicus, Colossoma macropomum* (Characidade) and hybrid tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*). *Ciência Animal Brasileira*, 11(2): 363-368.

Tort, L., Balasch, J.C.; Mackenzie, S. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Imunología*, 22(3): 277-286.

Tortolero, S.A.R; Soares, M.C.F.; Mera, P.A.S.; Monteiro, J.M.F. 2010. Efeito da densidade de estocagem no crescimento do matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) em gaiolas de pequeno volume. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 5(1): 81-92.

Treves-Brown, K.M. 2000. Applied fish pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Urbinati, E.C.; Carneiro, P.C.F. 2001. Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus*, (Teleost:Characidae) to stress of transport under influence of benzocaine. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 16(1): 75-85.

Urbinati, E.C.; Carneiro, P.C.F. 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds). *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva.* Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. São Paulo. p. 171-193.

Urbinati, E.C.; Carneiro, P.C.F. 2006. Sodium chloride added to transport water and physiological responses of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae). *Acta Amazonica*. 36: 569-572.

Urbinati, E.C.; Abreu, J.S.; Camargo, A.C.S. e Landines, M.A. 2004. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. *Aquaculture*. 229: 389-400.

Verdouw, H.; Van Echted, C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Research*, 12(6): 397-402.

Wang, Y.C.; Chang, P.S.; Chen, H.Y. 2008. Differential time-series expression of immunerelated genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of b-1, 3-glucan. *Fish & Shellfish Immunology*, 24:113-121.

Wedemeyer, G. A. 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Nova York: Chapman & Hall. 232 p.

Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77: 591-625.

Weys, F.A.A.; Verburg-Van Kemenade, B.M.L.; Flik, G. 1998. Characterisation of glucocorticoid receptors in peripheral blood leukocytes of carp, *Cyprinus carpio* L. *General and Comparative Endocrinology*, 111: 1-8.

Whittington, R.; Lim, C.; Klesius, P.H. 2005. Effect of dietary β-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus. Aquaculture*. 248: 217-225.

Wilson, R.W.; Wright, P.M.; Munger, S.; Wood, C.M. 1994. Ammonia excretion in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the importance of gill boundary layer acidification: lack of evidence for Na+/NH4 + exchange. *Journal of Experimental Biology*, 191: 37-58.

Wright, P.A.; Land, M.D. 1998. Urea production and transport in teleost fishes. *Comparative Biochemistry Physiology*, 119: 47–54.

Yildiz H.Y. 2006. Plasma lysozyme levels and secondary stress response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after exposure to Leteux-Meyer mixture. *Turkey Journal of Animal Science,* 30: 265-269.

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas da água do viveiro com criação de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum,* em tanques-rede, durante 60 dias alimentados com dietas suplementadas com 5 mg de glicano.kg^{-1} e 250 mg de levamisol.kg^{-1} de ração. Média± DP

Variáveis	**Média ± DP**
Temperatura (ºC)	28,90 ± 0,30
pH	7,26 ± 0,18
Oxigênio dissolvido (mg.L^{-1})	6,53 ± 0,40
Alcalinidade (mg $CaCO_3$.L^{-1})	20,90 ± 11,04
Dureza (mg $CaCO_3$.L^{-1})	15,09 ± 7,18
Condutividade (µS.cm^{-1})	61,17 ± 2,70
CO_2 (mg.L^{-1})	28,50 ± 1,42
Amônia total (mg.L^{-1})	0,81 ± 0,07
Amônia tóxica (mg.L^{-1})	0,005 ± 0,01
Nitrito total (mg.L^{-1})	0,015 ± 0,02

Tabela 2. Variáveis físicas e químicas da água das sacolas após 6 horas de transporte de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum,* alimentados por 60 dias com dietas suplementadas com imunoestimulantes. TR1 = ração comercial (sem suplementação); TR2 = ração suplementada com 5 mg de glicano.kg^{-1} de ração; TR3 = ração suplementada com 250 mg de levamisol.kg^{-1} de ração. Média ± desvio padrão.

Variáveis	**Tratamentos**			
	Antes do transporte	**TR1**	**TR2**	**TR3**
Temperatura (ºC)	29,86 ± 0,78**a**	34,5 ± 0,80**b**	34,4 ± 0,20**b**	34,8 ± 0,50**b**
pH	5,98 ± 0,65	6,58 ± 0,50	6,68 ± 0,30	6,58 ± 0,10
Oxigênio dissolvido (mg.L^{-1})	5,97 ± 0,46	4,50 ± 0,10	4,68 ± 0,20	4,47 ± 0,20
Alcalinidade (mg $CaCO_3$.L^{-1})	14,52 ± 0,92**a**	28,5 ± 0,90**b**	27,3 ± 0,82**b**	29,75 ± 0,75**b**
Dureza (mg $CaCO_3$.L^{-1})	14,75 ± 1,32	15,40 ± 2,50	15,10 ± 2,60	16,54 ± 2,45
Condutividade (µS.cm^{-1})	11,67 ± 1,2	12,90 ± 0,56	11,57 ± 0,43	10,97 ± 0,75
CO_2 (mg.L^{-1})	11,63 ± 1,08**a**	19,5 ± 2,50**b**	21,0 ± 1,60**b**	22,8 ± 1,80**b**
Amônia Total (mg.L^{-1})	0,048 ± 0,03**a**	3,45 ± 0,05**b**	3,73 ± 0,05**b**	3,87 ± 0,07**b**
Amônia Tóxica (mg.L^{-1})	0,003 ± 0,001**a**	0,01 ± 0,01**b**	0,01 ± 0,02**b**	0,01 ± 0,02**b**
Nitrito total (mg.L^{-1})	0,002± 0,01**a**	0,056 ± 0,003**b**	0,043 ± 0,004**b**	0,047 ± 0,008**b**

Dados expessos em média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis antes e imediatamente após o transporte.

Tabela 3. Variáveis físicas e químicas da água dos tanques de recuperação, durante 96 h, dos juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com imunoestimulantes e submetidos ao estresse de transporte. TR1 = ração comercial (sem suplementação); TR2 = ração suplementada com 5 mg de glicano.kg^{-1} de ração; TR3 = ração suplementada com 250 mg de levamisol.kg^{-1} de ração.

Variáveis	**Tratamentos**		
	TR1	**TR2**	**TR3**
Oxigênio (mg.L^{-1})	6,38 ± 0,67	6,57 ± 0,39	6,49 ± 0,42
Temperatura (ºC)	29,45 ± 0,13	29,86 ± 0,42	29,17 ± 0,51
pH	6,03 ± 0,43	6,39 ± 0,35	6,28 ± 0,72
Condutividade (µS.cm^{-1})	19,22 ± 1,32	19,78 ± 0,92	20,15 ± 0,34
Amônia Total (mg.L^{-1})	0,052 ± 0,01	0,048 ± 0,02	0,055 ± 0,01
Nitrito (mg.L^{-1})	0,003 ± 0,01	0,002 ± 0,02	0,003 ± 0,01
Alcalinidade (mg $CaCO_3$.L^{-1})	13,45 ± 1,32	12,94 ± 1,51	13,72 ± 01,48
Dureza (mg $CaCO_3$.L^{-1})	13,45 ± 0,97	14,62 ± 1,43	13,71 ± 1,25
CO_2 (mg.L^{-1})	11,63 ± 1,63	12,95 ± 1,39	12,63 ± 1,47

Dados expessos em média ± desvio padrão.

Tabela 4. Consumo diário de ração (CDR), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), fator de condição (FC), coeficiente de variação do crescimento (CV), taxa de sobrevivência (TS) e produção por área (P/A) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas suplementadas com imunoestimulantes, durante 60 dias, em sistema de tanque-rede. TR1 = ração comercial (sem suplementação); TR2 = ração suplementada com 5 mg de glicano.kg^{-1} de ração; TR3 = ração suplementada com 250 mg de levamisol.kg^{-1} de ração.

Tratamentos	**Parâmetros zootécnicos**						
	CDR (g)	CAA	TCE (%/dia)	FC	CV	TS (%)	P/A (peixes/ m^2)
TR1	2,71 ± 0,05	1,62 ± 0,08	2,78 ± 0,06	3,30 ± 0,5	6,92 ± 1,2	100,0	40,0
TR2	2,74 ± 0,04	1,70 ± 0,05	2,70 ± 0,05	3,73 ± 0,4	7,76 ± 0,9	100,0	40,0
TR3	2,76 ± 0,05	1,66 ± 0,06	2,76 ± 0,08	2,85 ±0,8	9,34 ± 0,8	100,0	40,0

Dados expessos em média ± desvio padrão.

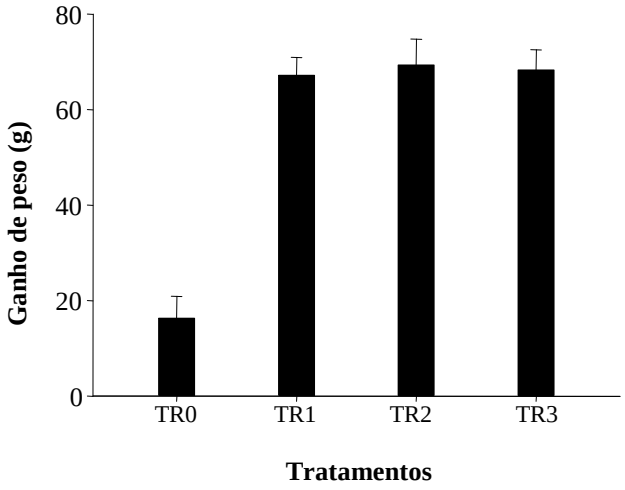

Figura 1. Ganho de peso (GP) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, criados em sistema de tanques-rede e alimentados por 60 dias com e sem suplementação de levamisol e glicano na dieta. TR0 = início dos experimentos; TR1 = controle (sem suplementação); TR2 = ração + 5 mg glicano.kg^{-1}; TR3 = ração + 250 mg levamisol.kg^{1}. Média ± desvio padrão.

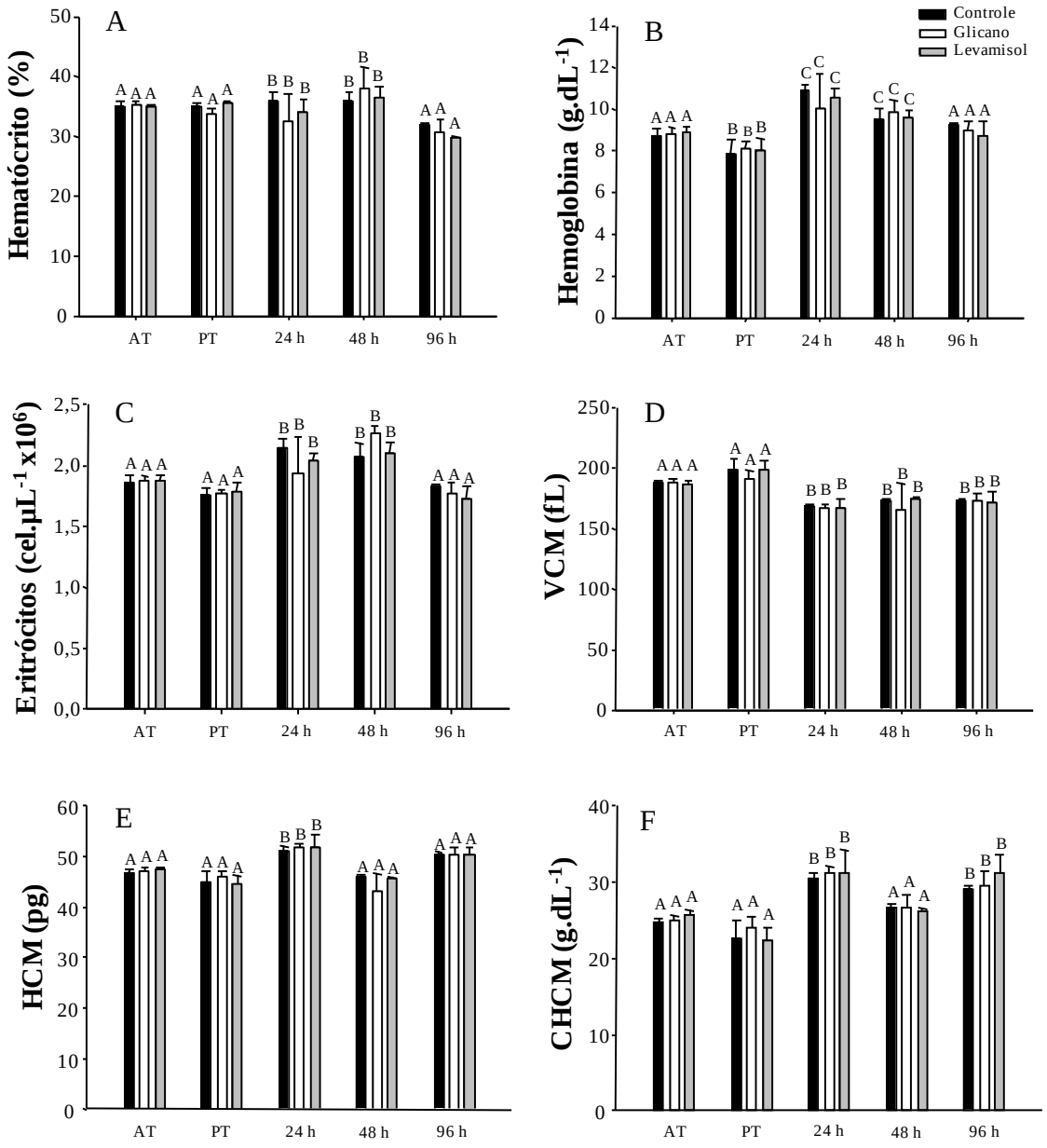

Figura 2. Hematócrito (A), hemoglobina (B), número de eritrócitos (C), volume corpuscular médio - VCM (D), hemoglobina corpuscular média - HCM (E) e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM (F) de *Colossoma macropomum* criada em sistema de tanques-rede e alimentada por 60 dias com e sem suplementação de levamisol e glicano na dieta (AT) e submetidos por 6 h ao transporte (PT) e a recuperação por 24, 48 e 96 h. Média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas no mesmo tratamento entre as diferentes etapas do transporte (N = 18 peixes).

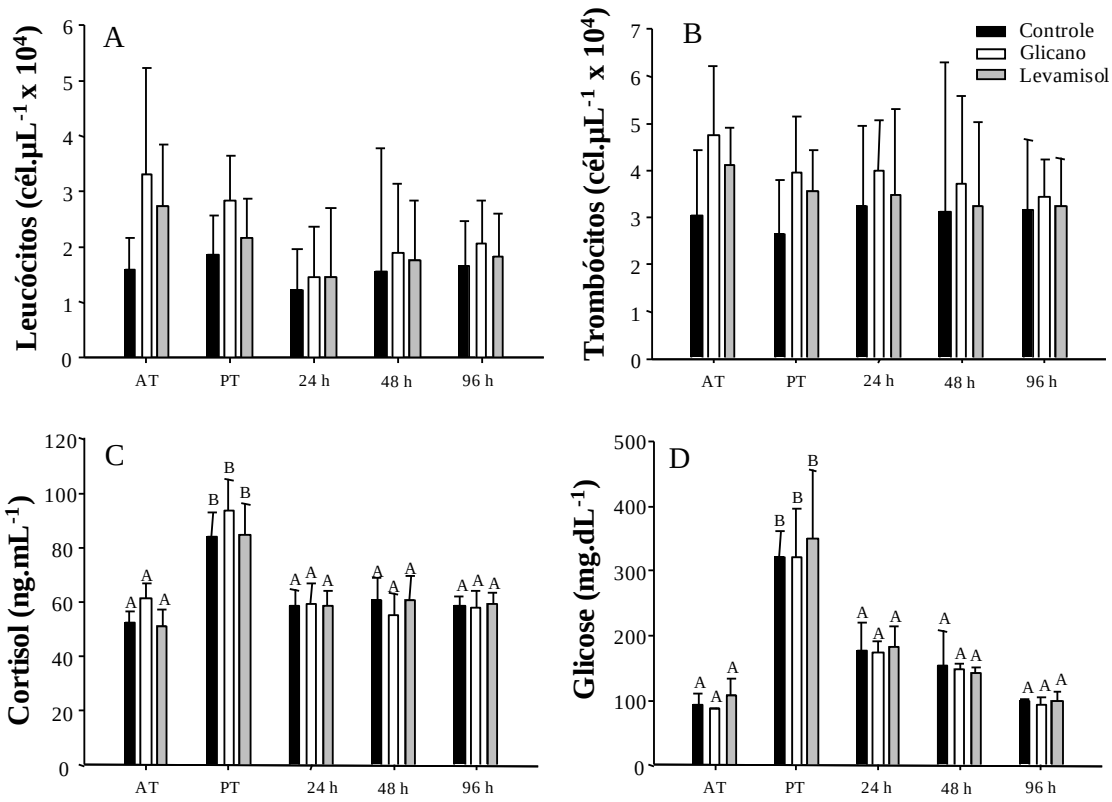

Figura 3. Leucócitos (A), trombócitos (B), cortisol (C) e glicose (D) de *Colossoma macropomum* criado em sistema de tanques-rede e alimentado por 60 dias com e sem suplementação de glicano e levamisol na dieta (AT) e submetidos por 6 h ao transporte (PT) e a recuperação por 24, 48 e 96 h. Média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas no mesmo tratamento entre as diferentes etapas do transporte (N = 18 peixes).

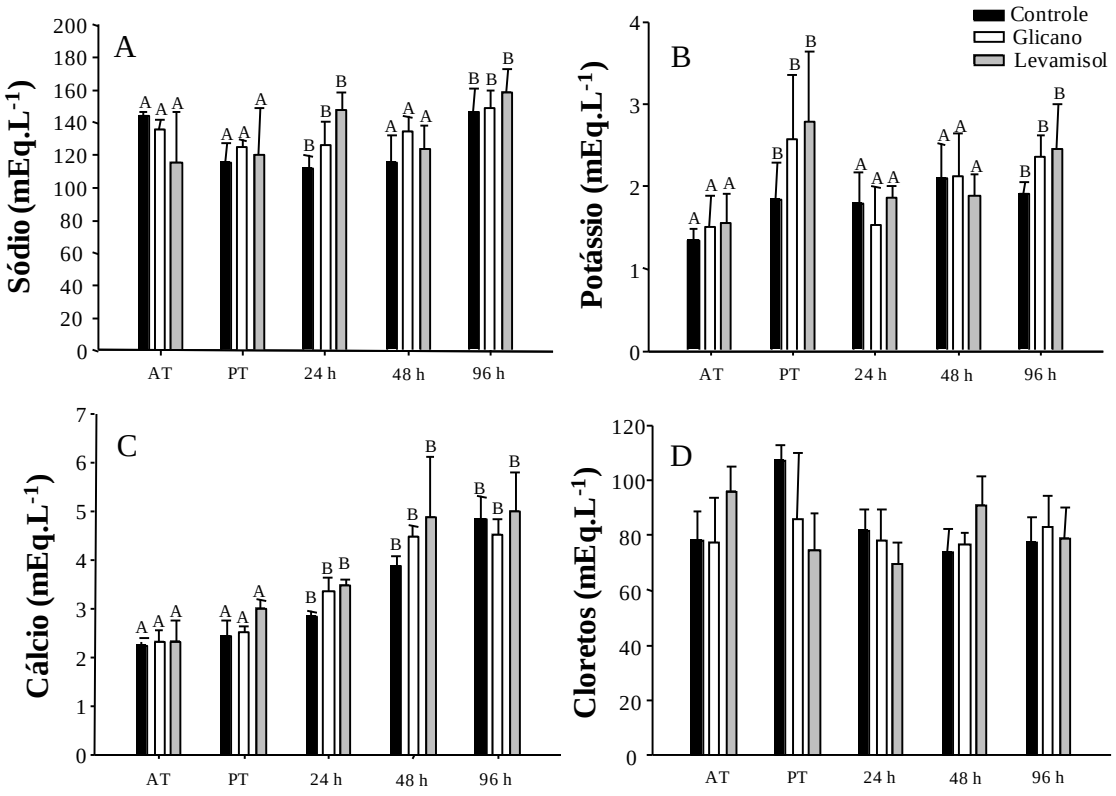

Figura 4. Concentração plasmática de sódio (A), potássio (B), cálcio (C) e cloretos (D) de *Colossoma macropomum* criado em sistema de tanques-rede e alimentado por 60 dias com e sem suplementação de glicano e levamisol na dieta (AT) e submetidos por 6 h ao transporte (PT) e a recuperação por 24, 48 e 96 h. Média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas no mesmo tratamento entre as diferentes etapas do transporte (N = 18 peixes).

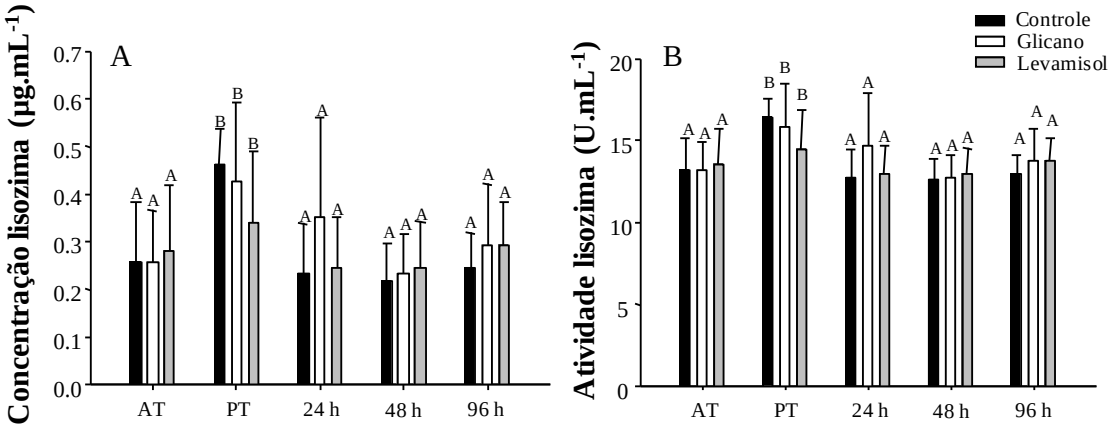

Figura 5. Concentração (A) e atividade de lisozima (B) de *Colossoma macropomum* criado em sistema de tanques-rede e alimentado por 60 dias com e sem suplementação de glicano e levamisol na dieta (AT) e submetidos por 6 h ao transporte (PT) e a recuperação por 24, 48 e 96 h. Média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas no mesmo tratamento entre as diferentes etapas do transporte (N = 18 peixes).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, a suplementação de glicano e levamisol na dieta do tambaqui durante 60 dias de criação em tanques-rede não proporcionou melhor desempenho zootécnico nos animais, embora os resultados apresentados tenham sido satisfatórios para a produção do tambaqui, demonstrando boa adaptação desta espécie a esse sistema de criação. É provável que ausência de efeito significativo sobre o desempenho produtivo, observada neste estudo, esteja relacionada à boa qualidade das condições experimentais.

Em relação ao desafio bacteriano, foi verificado que a suplementação da dieta com levamisol e glicano não foi capaz de mitigar os efeitos negativos causados pela infecção por *Aeromonas hydrophila*, pois as respostas fisiológicas dos peixes suplementados com os imunoestimulantes não foram diferentes das evidenciadas nos animais do grupo controle. Além disso, foi verificado que o tambaqui apresenta alta tolerância à bactéria *A. hydrophila*.

A suplementação de levamisol e glicano na dieta, nas concentrações de 250 e 5 $mg.kg^{-1}$ respectivamente, não foram capazes de mitigar os efeitos adversos do estresse de transporte em juvenis de tambaqui, sendo observado, ainda, que a espécie possui uma capacidade adaptativa para retornar a homeostase após o período de 24 horas de recuperação pós-transporte.

Dentro das condições do presente trabalho, evidencia-se a necessidade de mais estudos com concentrações mais elevadas que as testadas neste trabalho, além da avaliação de diferentes períodos de suplementação, a fim de se obter resultados mais conclusivos sobre o efeito do levamisol e glicano como imunoestimulante para o tambaqui.