

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

**TRATAMENTOS PROFILÁTICOS EM OVOS EMBRIONADOS DE
Colossoma macropomum: AÇÃO DE DIFERENTES AGENTES E CONCENTRAÇÕES
SOBRE A TAXA DE ECLOSÃO.**

Pedro Henrique Salomão

PORTO ALEGRE

2015/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

**TRATAMENTOS PROFILÁTICOS EM OVOS EMBRIONADOS DE
Colossoma macropomum: AÇÃO DE DIFERENTES AGENTES E CONCENTRAÇÕES
SOBRE A TAXA DE ECLOSÃO.**

Autor: Pedro Henrique Salomão

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção da Graduação em Medicina Veterinária.

Orientador: Ender R. Oberst

Co-orientador: Raycon R. F. Garcia

PORTO ALEGRE

2015/1

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, mãe, pai, avó, irmã, tios, tias, primos e primas pelo apoio incondicional e por confiarem em mim, saibam que eu amo vocês! (Mala, tu sempre fez e sempre fará parte da minha família!). A todos os que são e os que foram membros do grupo AQUAM onde tive a oportunidade de conhecer, criar vínculos, aprender e até ensinar. A minha orientadora, a professora Enefer R. Oberst, que foi quem, indiretamente, me introduziu ao ramo que quero trabalhar e por ter sempre acreditado na minha capacidade. Ao professor Danilo Pedro Streit Jr. por ter me aturado todos esses anos como bolsista e por sempre oferecer grandes oportunidades de crescimento profissional e também pessoal. Ao meu amigo e coorientador, Raycon R. F. Garcia por estar sempre disponível quando precisei, me ajudando a crescer profissionalmente e sempre estimulando a buscar novos horizontes. Aos responsáveis pela piscicultura Boa Esperança, seu Pedrinho e Simone Yokoyama, por ensinarem na prática tudo que a teoria não permite e por serem exemplos de dedicação aquilo que fazem. Enfim, a todos que, de alguma forma, colaboraram com a execução e a finalização desse trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, tanto aos aqui presentes quanto aqueles que já fizeram sua parte e agora descansam.

*“If you sang the song the way it was written
and if you march along to the beat of drum.*

Someday soon, you`re gonna wake singin`:

The battle is over, but the war goes on!

...

If talk was money, I`d be a millionaire

If thoughts could kill, there`ll be no one here

So many thinkin` evil, and talking jive

But it`s only through love, that our world can stay alive

The battle is over, but the war goes on!”

Sonny Terry & Brownie McGhee.

RESUMO

O tratamento profilático de ovos embrionados busca a redução da carga patogênica da superfície dos ovos, sem causar danos. Uma das formas de assegurar que o tratamento aplicado não compromete a qualidade dos ovos é por meio da taxa de eclosão. Porém, os agentes profiláticos e as concentrações a serem aplicadas na reprodução de espécies nativas ainda não são bem definidos. Este trabalho teve como objetivo estudar e avaliar a influência dos principais agentes profiláticos sobre a taxa de eclosão de ovos embrionados de tambaqui (*Colossoma macropomum*) nas seguintes concentrações: Oxitetraciclina (T1C1 – 10 mg/L; T1C2 – 25 mg/L; T1C3 – 50 mg/L; T1C4 – 100 mg/L); Cloreto de Sódio (T2C1 – 2,5 g/L; T2C2 – 5,0 g/L; T2C3 – 7,5 g/L; T2C4 – 10,0 g/L); Formol (T3C1 – 0,10 ml/L; T3C2 – 0,12 ml/L; T3C3 – 0,16 ml/L; T3C4 – 0,25 ml/L) e Iodo (T4C1 – 25 mg/L; T4C2 – 50 mg/L; T4C3 100 mg/L; T4C4 – 200 mg/L). Um grupo controle foi mantido sem agentes profiláticos. Oito horas após a fertilização, cem ovos embrionados foram separados em amostras, submetidos aos tratamentos em triplicata, em banhos de 10 minutos, nas respectivas concentrações e devolvidos às incubadoras experimentais até o momento da eclosão. Posteriormente, pela avaliação da quantidade de ovos não eclodidos, se obteve taxa de eclosão. Os tratamentos que utilizaram oxitetraciclina, cloreto de sódio e formol não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$) para as taxas de eclosão em nenhuma das concentrações quando comparadas ao grupo controle. Contudo, a utilização do iodo em todas as concentrações testadas reduziu significativamente ($P < 0,05$) a taxa de eclosão, quando comparado aos demais tratamentos e ao grupo controle. A oxitetraciclina, o cloreto de sódio e o formol, nas condições testadas, podem ser utilizados durante o período final de incubação dos ovos. Já o iodo deve ser submetido a novos testes, com tempos de exposição e concentrações diferentes.

Palavras-chave: tambaqui, profilaxia, ovos embrionados, oxitetraciclina, cloreto de sódio, formol, iodo.

ABSTRACT

The prophylactic treatment on fish eggs seeks to decrease pathogenic load on the egg's surface without causing them any harm. One way of assuring that egg's quality will not be reduced is by measuring eggs' hatching success. However the chemical agents and their concentration to be used in breeding native species are not yet well defined. The aim of this work was to study and evaluate the influence of the most common prophylactic agents on eggs' hatching success rate of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the following concentrations: Oxytetracycline (T1C1 - 10 mg / L; T1C2 - 25 mg / L; T1C3 - 50 mg / L; T1C4 - 100 mg / L); Sodium chloride (T2C1 - 2.5 g / L / T2C2 - 5.0 g / L; T2C3 - 7.5 g / L; T2C4 - 10.0 g / L); Formaldehyde (T3C1 - 0.10 ml / L; T3C2 - 0.12 ml / L; T3C3 - 0.16 ml / L; T3C4 - 0.25 ml / L) and iodine (T4C1 - 25 mg / L; T4C2 - 50 mg / L; T4C3 100 mg / L; T4C4 - 200 mg / L) and control. Eight hours after fertilization, one hundred eggs were separated into individual samples and each sample in triplicate, they received ten minutes bath treatments at their respective concentrations and returned to their experimental hatcheries until hatch occurs. Subsequently by the number of non-hatched eggs, the rate hatching was obtained. The treatments that used oxytetracycline, sodium chloride and formaldehyde did not differ statistically ($P > 0.05$) in the tested concentrations, as well as the hatching rates, respectively, showed no statistical difference ($P > 0.05$) when compared to the control. However, the use of iodine was more harmful to the eggs, in all tested concentrations it's reduced significantly ($P < 0.05$) when compared to other treatments and control in hatching rates. The prophylactic handling, in the way that has been tested, showed that oxytetracycline, sodium chloride, and formalin can be used without decreasing *C. macropomum*'s eggs hatching rates. Yet, iodine should be subjected to further tests with different times and concentrations.

Keywords: tambaqui, prophylaxy, fish eggs, oxytetracycline, sodium chloride, formaldehyde, iodine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPM – Boas Práticas de Manejo

CaCO₃ – Carbonato de Cálcio

CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária

EHC – Extrato Hipofisário de Carpa

I.N. – Instrução Normativa

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura

Na – sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

O₂ – Oxigênio

O₂D – Oxigênio Dissolvido

OESA – Órgão Executor de Sanidade Agropecuária

pH – potencial hidrogeniônico

PNSAA – Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos

ppm – partes por milhão

PV – Peso Vivo

PVP-I – Iodopovidine

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	ESPÉCIE EM ESTUDO	12
2.2	CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DO TAMBAQUI	13
2.3	SANIDADE	15
2.3.1	Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos (PNSAA)	15
2.3.2	Sanidade piscícola	15
2.3.3	Cloreto de Sódio (NaCl)	19
2.3.4	Formol 4%	20
2.3.5	Oxitetraciclina	21
2.3.6	Iodo	22
3	ARTIGO	24
3.1	INTRODUÇÃO	24
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.2.1	Manejo sanitário e qualidade da água	25
3.2.2	Obtenção dos ovos embrionados	25
3.2.3	Tratamentos e execução	26
3.2.4	Parâmetros avaliados	27
3.2.5	Delineamento experimental	27
3.3	RESULTADOS	28
3.4	DISCUSSÃO	29
3.5	CONCLUSÕES	31
3.6	REFERÊNCIAS	31
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
	REFERÊNCIAS	35
	ANEXOS	42

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura nacional vem apresentando um crescimento constante e as pesquisas têm auxiliado na consolidação deste setor (GASTALHO; DA SILVA e RAMOS, 2014). Das espécies nativas, o tambaqui *Colossoma macropomum*, é a mais produzida (BRASIL, 2012), devido a suas características de cultivo e aceitabilidade pelo consumidor (MELO; IZEL e RODRIGUES, 2001; IZEL e MELO, 2004). O manejo profilático mostra relevância principalmente com a intensificação da cadeia produtiva, pois assegura a produtividade e garante alimentos saudáveis e seguros para a população (TAVARES *et al.*, 2013; TAVECHIO; GUIDELLI e PORTZ, 2009).

A definição de manejo profilático é toda ação que visa prevenir o surgimento e a propagação de enfermidades (PÁDUA e FILHO, 2012). Para isso o manejo sanitário deve ser aplicado nas diversas etapas da cadeia piscícola, com tratamentos utilizando banhos, pulverização ou por via interna (ração ou injeção) (GASTALHO; DA SILVA e RAMOS, 2014).

No Brasil ainda há uma carência na legislação específica para os tipos de tratamentos que podem ser utilizados na piscicultura (CAMPOS, 2005) diferente do que ocorre em outros países. Por isso a utilização de forma empírica ainda é muito comum. Entre os principais agentes utilizados na piscicultura estão: cloreto de sódio (NaCl); formalina ou formol; oxitetraciclina e iodo (CRUZ *et al.*, 2006; KATHARIUS *et al.*, 2007; OVERTON; BRUUN e DALSGAARD, 2010).

As recomendações para a utilização dos principais agentes profiláticos são muito variadas, pois dependem de fatores como a espécie produzida, a qualidade da água, o tempo de exposição e a concentração do meio. Por exemplo, a utilização de 30g/L de cloreto de sódio, por 15 minutos, para controle de fungos, se mostrou eficiente além de ter proporcionado uma melhora na taxa de eclosão (SCHREIER; RACH e HOWE, 1996), porém sua utilização no controle de helmintos monogenóides o agente não apresentou eficiência em nenhuma das concentrações testadas (CHAGAS *et al.*, 2012). A utilização de no mínimo 1.000 ppm de formol também foi eficiente no controle fúngico (CORRÊA *et al.*, 2013) sem comprometer a homeostasia dos peixes (ARAÚJO *et al.*, 2004). Os banhos de oxitetraciclina são bacteriostáticos e podem ser considerados seguros, pois não causam danos à espécie não alvo, quando utilizada em concentração de até 0,1 mg/L (CRUZ *et al.*, 2006), porém esta substância pode reduzir os níveis de oxigênio dissolvido na água. A exposição a soluções a

base de iodo não são eficientes para o controle fúngico (CORRÊA *et al.*, 2013), contudo na desinfecção bacteriana da superfície de ovos embrionados de peixes marinhos é eficaz (KATHARIUS *et al.*, 2007; OVERTON; BRUUN e DALSGAARD, 2010).

O uso de tratamentos profiláticos em ovos pode ser eficiente Overton, Bruun e Dalsgaard, (2010), principalmente pelo fato dos peixes não apresentarem imunidade hereditária. Por isso, diante da importância do manejo sanitário, objetivou-se neste trabalho, estudar e avaliar o efeito dos agentes profiláticos sobre a taxa de eclosão de ovos embrionados de *C. macropomum* em diferentes concentrações. Para tanto, estão apresentados a seguir uma revisão bibliográfica sobre o tema e um experimento realizado, descrito na forma de artigo científico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espécie em estudo

O Tambaqui, *Colossoma macropomum*, é considerado um peixe redondo, pertencente à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Serrasalminae, pode ser considerado relativo das piranhas e dos pacus (Oliveira *et al.*, 2011). Originária da América do Sul, nas bacias dos Rios Amazonas e Orinoco o *C.macropomum*, é a espécie considerada “símbolo ictífico” da floresta tropical. Possui hábitos onívoros, é favorecido pelos seus dentes molariformes afiados, quando adultos costumam ingerir frutos e sementes. Na natureza, vive em águas quentes ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) e eutrofizadas (com muita matéria orgânica e baixas concentrações de O_2D) e em épocas de seca, principalmente, a espécie apresenta uma adaptação morfológica natural: (semelhante a que ocorre com o salmão) seu lábio inferior torna-se prolapsado e assim, ele quebra a lâmina d’água, aumentando em até 30% o teor de O_2 captado e distribuído pelo sangue. Essas características juntamente com uma alta prolificidade e produtividade, um bom potencial de crescimento, rusticidade, um alto potencial zootécnico e a aceitação pelos consumidores fazem dele a espécie nativa mais produzida no país. (JACOMETO *et al.*, 2010; DAIRIKI, 2011; KUBTIZA, 2012).

Devido a sua importância na piscicultura nacional esta espécie foi alvo de uma rede de pesquisas denominada: Aquabrazil, que visava o melhoramento genético através do aumento da taxa de crescimento. Além disso, o manejo alimentar em diferentes fases da produção e a reprodução em cativeiro já são técnicas bem dominadas (DA SILVA CAMARGO *et al.*, 1998; JÚNIOR *et al.*, 1998; PONZONI *et al.*, 2006; RESENDE; DE OLIVEIRA e PUCHNICK, 2010).



Figura 1–Exemplar de *Colossoma macropomum* utilizado no presente experimento.

2.2 Características reprodutivas do tambaqui

A reprodução do *C. macropomum* acontece comumente nos períodos de chuva, entre os meses de outubro a março (CECCARELLI *et al.*, 2000). Por ser uma espécie síncrone total, após a maturação, seus gametas (espermatozoides e oócitos) são liberados em sua totalidade em uma única desova (VAZZOLER, 1996).

Os gametas de peixes de água doce apresentam peculiaridades, tais como células espermáticas imóveis no plasma seminal e ausência de acrossoma (VIVEIROS; ORFÃO e LEAL, 2014). Para que a fecundação ocorra, o oócito conta com um orifício denominado micrópila que facilita a entrada do espermatozoide (RIZZO e BAZZOLI, 2014). Ambas, células espermáticas e oócitos sofrem influência osmótica da água; o espermatozoide torna-se ativo e inicia o movimento flagelar, e no oócito ocorre o fechamento da micrópila (NAKATANI, 2001; RIZZO e BAZZOLI, 2014; VIVEIROS; ORFÃO e LEAL, 2014). Em geral, nos teleósteos, após o contato com a água, o tempo de vida da célula espermática e o fechamento da micrópila é cerca de um minuto (NAKATANI, 2001; VIVEIROS; ORFÃO e LEAL, 2014).

Porém, existem fatores externos para que haja a produção, maturação, liberação e fecundação eficientes dos gametas, para isso são necessários manejos específicos, desde a nutrição das matrizes, cuidados com sua saúde, até a qualidade da água. Por exemplo, os parâmetros indicados para qualidade da água são: oxigênio dissolvido (O₂D): 5-7mg/L; dureza e alcalinidade: mínimo de 30mg/L; pH: 7- 8 e Temperatura: 26 -29 °C (MURGAS *et al.*, 2012; STREIT JR. *et al.*, 2012).

Contudo, apenas esses controles não são suficientes para desencadear uma resposta endócrina apropriada para a maturação dos gametas, já que o tambaqui é uma espécie reofílica, ou seja, faz a migração durante a época reprodutiva. Em cativeiro pode apresentar supressões fisiológicas no processo de reprodução. Tais restrições impedem a maturação final dos gametas femininos, caracterizada pela migração do núcleo, do centro para a lateral do oócito, e pela quebra da vesícula nuclear. Nos machos, a espermiacção ocorre com baixo volume seminal, que é insuficiente para a reprodução artificial (ZOAR e MYLONAS, 2001; ANDRADE *et al.*, 2003; MUNIZ *et al.*, 2008; MURGAS *et al.*, 2011).

Para suprir estas restrições, a administração hormonal é o principal método utilizado atualmente. Dentre os hormônios utilizados, existem análogos sintéticos de GnRH, comercializados como Ovipel e Ovaprim, contudo, o mais utilizado é oriundo do extrato hipofisário de carpa (EHC) que contem gonadotropinas, principalmente, o LH (ANDRADE *et al.*, 2003; MUNIZ *et al.*, 2008; STREIT JR. *et al.*, 2002; STREIT JR. *et al.*, 2004; ZARSKI *et al.*, 2009). A posologia utilizada para administração de cada hormônio varia de acordo com a espécie e com o peso do animal, por exemplo, a dose de indução para o EHC é 5,5 mg e 2,5 mg de EHC/kg PC em fêmeas e machos, respectivamente. (STREIT JR. *et al.*, 2012). Sua aplicação geralmente é realizada na prega da nadadeira peitoral do animal, no sentido crânio caudal, para evitar a perfuração cardíaca. (MUNIZ *et al.*, 2008; MARIA *et al.*, 2012; STREIT JR. *et al.* 2012; WOYNAROVICH e HORVÁTH, 1983; ZANIBONI-FILHO e BARBOSA, 1996; ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007;).

Horas após a indução hormonal, a extrusão dos gametas comumente é realizada manualmente, através de uma leve massagem abdominal no sentido crânio-caudal. Os oócitos são coletados em um recipiente plástico arredondado para não danificar os gametas, este deve estar seco e sem contaminantes. Em seguida, o sêmen é coletado através de seringas descartáveis, evitando-se a contaminação com água e outros agentes externos. É recomendado o cuidado na limpeza do orifício urogenital dos peixes, para evitar possíveis contaminações (MARIA *et al.*, 2011; MURGAS *et al.*, 2012). Depois de coletados, a fertilização pode ser feita com duas metodologias: a úmida; onde se adiciona água e os gametas simultaneamente ou a seco; ou seja, primeiramente se misturaram os gametas e depois se adiciona a água para ativá-los. A metodologia a seco é mais indicada, pois permite a realização de avaliações quantitativa e qualitativas dos gametas sem perdas nas taxas de fertilização (ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007; STREIT JR. *et al.*, 2012; SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2015).

2.3 Sanidade

2.3.1 Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos (PNSAA)

O Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos (PNSAA) foi instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Portaria N° 573, de 4 de junho de 2003, com o objetivo de regulamentar a produção de animais aquáticos no país. O Regulamento Técnico padronizando as ações profiláticas, métodos de diagnósticos e o saneamento dos estabelecimentos de aquicultura Foi aprovado pela Instrução Normativa N° 53, de 2 de julho de 2003.

A sanidade agropecuária trata da adesão de medidas que visam produzir de forma a garantir um alimento seguro, de qualidade, sustentável e que zele pela saúde da população. (EMATER, 2015). Para assegurar essa produção é necessária a atuação de diferentes elos da cadeia produtiva, do Ministro do MPA até técnicos extensionistas, produtores e consumidores, de onde partem as demandas e também onde se repercutirão os efeitos dessas medidas (BRASIL, 2003).

Dentro da cadeia da aquicultura, ações recentes têm sido aplicadas, como a Instrução Normativa 03 de 24 de outubro de 2014 que, de acordo com o Art. 1, visa instituir o Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos de Cultivo. Este, por sua vez, tem por objetivo “garantir a sustentabilidade dos sistemas de produção de animais aquáticos e a sanidade da matéria-prima obtida a partir de cultivos nacionais”, aplica-se a todos os estabelecimentos que cultivam ou mantêm animais aquáticos e que estiverem cadastrados ao Órgão Executor de Sanidade Agropecuária (OESA).

De uma maneira semelhante às ações previstas pelo Comitê Regional de Medicina Veterinária (CRMV) dentro das medidas sanitárias que devem ser tomadas em um estabelecimento aquícola estão: o controle da entrada e saída de animais, a realização de quarentenas e a coleta de dados epidemiológicos referentes à saúde dos animais e a notificação de doenças. Essas informações têm um papel fundamental na implantação de técnicas profiláticas e na determinação dos manejos sanitários que deverão ser aplicados em uma piscicultura. (ARAÚJO *et al.*, 2009; TAVARES-DIAS *et al.*, 2013)

2.3.2 Sanidade piscícola

A sanidade dos peixes está correlacionada com o equilíbrio entre fatores que envolvem ambiente, indivíduo e agentes patogênicos. Em ambiente natural o animal está em equilíbrio com os microrganismos comensais, presentes nas escamas, mucosas e brânquias. Em

cativeiro, na produção animal, o manejo e o arraçamento inadequados, bem como a alta taxa de lotação e a ausência de cuidados higiênicos sanitários favorecem susceptibilidade a patogenia.

Os agentes patogênicos podem ser responsáveis pela ocorrência de surtos de doenças parasitárias e bacterianas e sua influência é limitante na produção piscícola (VALLADÃO, 2014). Entretanto cuidados devem ser tomados em todas as etapas de criação dentro de uma piscicultura, além do mais, outro fator de alto risco sanitário é o transporte de peixes entre pisciculturas, pois esta é uma forma comum de introdução de agentes patogênicos nos cultivos de todos os estados brasileiros (GASTALHO; DA SILVA e RAMOS, 2014). Portanto o controle e a prevenção, como sugeridos pelos órgãos sanitários responsáveis, são de grande importância para a cadeia produtiva.

A realização dos controles terapêuticos na piscicultura pode ser conduzida de diversas maneiras, entre elas; banhos de imersão, com diferentes tempos de duração, aplicações internas, pela administração na ração, ou por vacinas, intra-parenteral ou oral e também de modo tópico através da pulverização (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; SCHALCH; TAVARES-DIAS e ONAKA, 2009). Para o controle de doenças, diferentes agentes e concentrações são utilizados. Na Tabela 1, são apresentados alguns dos principais agentes utilizados no controle das respectivas enfermidades na piscicultura, além de fatores que limitam suas aplicabilidades.

Os tratamentos em peixes devem ser realizados se estritamente necessários, pois o manejo em si é um fator estressante para os animais. Além disso, ele deve ser realizado sob a orientação e supervisão de um profissional capacitado, o qual deve decidir a necessidade do uso e da concentração de determinado agente para o controle e tratamento das enfermidades específicas (LEITE, 2002; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; SCHALCH; TAVARES-DIAS e ONAKA, 2009).

Tabela 1 – Tratamentos profiláticos para os principais agentes patogênicos encontrados na piscicultura e seus fatores limitantes

Substâncias	Principais Patógenos	Fatores Limitantes Para o Uso
Cloreto de Sódio (NaCl)	I. multifillis, Trichodina, P. pillulare, Chilodonella, Argulus, Dolops, fungos, Monogenea, Ergasilídeos, Ichthyobodo necator, Flavobacterium	Não há fatores conhecidos que impossibilitem o uso
Permanganato de Potássio (KmnO₄)	Monogenea, Trichodina, Argulus, Dolops, Chilodonella, Ichthyobodo necator, bactérias gram negativas	Não deve ser usado em águas eutrofizadas com pH<5,0 ; concentrações terapêuticas podem ser tóxicas para algumas espécies
Sulfato de Cobre (CuSO₄)	Monogenea, Thichodina, P. pillulare, I. multifillis, Chilodonella, bactérias, fungos	Alcalinidade <50 mg/L de CaCO ₃ aumenta a toxicidade; alcalinidade >250 mg/L de CaCO ₃ o produto não tem efeito desejado; resíduos de cobre nos tecidos por até 30 dias
Sulfamerazina	Bactérias do gênero Pseudomonas	Pode ser tóxica quando administrada na dieta em concentração >220 mg/kg de peso corporal
Tetraciclina	Aeromonas, Pseudomonas, Edwardsiella	O uso de 7 mg/L pode diminuir o O ₂ D da água.
Cloramina-T	Monogenea, bactérias de pele e brânquias	Dose alta pode ser tóxica para algumas espécies. Dose usada depende do pH e da dureza da água.
Formalina	Monogenea, I. multifillis, P. pillulare, Trichodina, Chilodonella, Ichthyobodo necator, Argulus, Dolops, fungos	Toxicidade aumenta em temperaturas > 22 ^o C; tóxicos para o manipulador
Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)	Monogenea, fungos , bactérias	Toxicidade aumenta em temperatura elevada; concentrações terapêuticas podem ser estressantes para algumas espécies
Ácido acético	Monogenea, Trichodina, Chilodonella	Não há fatores conhecidos que impossibilitam o uso
Diflubenzuron	Lernaea, Argulus, Dolops	
Praziquantel	Monogenea, Cestoda, Digenea	
Levamisol	Monogenea	
Albendazo	Monogenea	
Mebendazol	Monogenea	

*Adaptado de: Schalch; Tavares-Dias e Onaka, 2009

A profilaxia deve ser realizada de modo a prevenir o surgimento das enfermidades, para isso sugere-se que seja feita nos estágios iniciais da cadeia produtiva, com medidas de biosseguridade, controle e prevenção de doenças. A prevenção deve ocorrer na preparação dos viveiros, no manejo dos os ovos que carregam patógenos verticalmente, pois o último é considerado a principal fonte de infecção (PÁDUA e FILHO, 2012; DE QUEIROZ, 2013), além de cuidados com as larvas e os juvenis. Estes animais são expostos a adensamentos populacionais, ao manejo e ao transporte, além de possuírem um sistema imunológico em desenvolvimento, que apresenta baixa eficiência. Todos esses são fatores que favorecem a ocorrência de surtos epizooticos. (; ARAÚJO *et al.*, 2009; PÁDUA e FILHO, 2012; PAVANELLI; EIRAS e TAKEMOTO, 2008; TAVARES-DIAS *et al.*, 2013).

Entre os manejos profiláticos realizados na piscicultura para evitar esses surtos estão: medidas higiênico-sanitárias, tais como; a higienização das mãos dos colaboradores; a desinfecção dos fômites, das incubadoras e das caixas de transporte; a preparação dos viveiros; o vazio sanitário e medidas preventivas ligadas diretamente ao animal, seus gametas, seus ovos e a água onde vivem.

A limpeza periódica e desinfecção dos fômites pode ser feita através do uso de agentes biocidas, como compostos clorados ou também soluções hipersaturadas de cloreto de sódio (NaCl) (PÁDUA e FILHO, 2012).

Na água, aferições rotineiras devem ser feitas para garantir que os parâmetros se mantenham no intervalo ideal: para o *C. macropomum*, uma temperatura entre 26 e 28°C; um pH entre 6,5 e 8,0; uma alcalinidade superior a 30mg/L de CaCO₃; o O₂D acima de 5mg de O₂/L, uma vez que valores inferiores a 3mg/L inibem o desenvolvimento gonadal (DE QUEIROZ *et al.*, 2006; MURGAS *et al.*, 2009; MURGAS *et al.*, 2012; PÁDUA e FILHO, 2012).

Nos viveiros são realizados: a calagem; para disponibilizar fósforo e garantir um pH mais alcalino e responsivo à fertilização da água, os benefícios são alcançados de 1 a 2 meses após o tratamento. No período de vazio sanitário é importante que o fundo do viveiro fique exposto ao sol por um período de 5 a 10 dias, a aplicação de cal virgem é usada para expurgação. A colocação de barreiras físicas, como telas, nas entradas de água é importante para impedir a entrada de peixes e outros macrorganismos indesejáveis à produção (DE QUEIROZ *et al.*, 2006; DE QUEIROZ, 2013).

No manejo com os animais, a aplicação de períodos de quarentena naqueles introduzidos no plantel, o tratamento das matrizes com suplementos na ração, entre eles, elementos imuno estimulantes, como vit. C, vit. E, glucanos, e outros. Também podem ser

usadas vacinas com esses compostos, além de banhos profiláticos com a utilização de diversos agentes, como por exemplo: formalina, cloreto de sódio, peróxido de hidrogênio, permanganato de potássio, derivados do iodo e etc. Esses banhos podem ser aplicados nos peixes adultos, em juvenis, nos seus gametas e também nos seus ovos (BERNARDES *et al.*, 2003; BOCK *et al.*, 2008; BRUM, 2003;; CHAGAS e VAL, 2003; CHAGAS *et al.*, 2009; CORRÊA *et al.*, 2013; PÁDUA e FILHO, 2012; PAVANELLI; EIRAS e TAKEMOTO, 2008; SCHALCH; TAVARES-DIAS e ONAKA, 2009;; TAVARES-DIAS *et al.*, 2013;).

Para programas de repovoamento e para peixes susceptíveis ao estresse por manejo e manipulação, técnicas de desinfecção dos ovos se mostraram ser possivelmente o procedimento mais indicado (MURGAS *et al.*, 2012). Pois, assim garantem que ao eclodirem, os juvenis não estarão expostos à cargas patogênicas oriundas dos pais, passíveis de causar prejuízos.

Diversos estudos que avaliaram diferentes agentes para a utilização em ovos de teleósteos, dentre os quais o NaCl, a formalina, a oxitetraciclina e o iodo serão expostos a seguir.

2.3.3 Cloreto de Sódio (NaCl)

O cloreto de sódio, ou sal, é de suma importância na piscicultura, pois, o íon sódio (Na^+) representa aproximadamente 80% dos sais que compõem o sangue dos peixes. Isso significa que atua diretamente sobre a osmoregulação dos peixes. Devido a isso, inúmeras são as utilidades desta substância: indutor de crescimento, controle de patógenos, redutor de estresse físico e osmótico. A tabela 3 retrata algumas das suas aplicações (KUBITZA, 2007; OBA *et al.*, 2009).

Seu uso profilático esta ligado diretamente com a redução do estresse físico; com o estímulo a produção de muco, que recobre áreas lesionadas e reduz infecções secundárias e que serve também na eliminação de resíduos orgânicos das brânquias os quais são potenciais causadores de inflamação. No estresse osmótico; quando há NaCl presente em quantidades similares à fisiológica, a perda de sais é reduzida (menor é a disfunção osmorregulatória), por estar em um ambiente “mais isosmótico”, dessa forma, reduz a liberação de cortisol e conseqüentemente, o acúmulo de glicose no sangue, ambos prejudiciais a homeostase do peixe quando em excesso. Para restabelecer a homeostase é necessário gastar energia, que tem

como consequência deprimir o sistema imunológico (CARMICHAEL *et al.*, 1986; CARNEIRO *et al.*, 1999; CARNEIRO *et al.*, 2001; KUBITZA, 2007; OBA *et al.*, 2009).

O cloreto de sódio também pode ser usado no combate a patógenos, no manejo profilático, essa aplicação é feita nos ovos embrionados, de forma a reduzir a carga patogênica presente antes da eclosão (DE MACEDO *et al.*, 2013; KUBITZA, 2009; PAVANELLI; EIRAS e TAKEMOTO, 2008).

Em estudo com o tratamento profilático de ovos embrionados de truta arco-íris, Schreier; Rach e Howe (1995) observaram que com 30g/L de NaCl, frente uma infecção fúngica de *Saprolegnia parasítica*, onde o grupo controle (infectado) apresentou uma taxa de eclosão de 27,3% e o tratado de 60,3%.

Por outro lado, uso desta substância tem-se a ineficiência frente alguns patógenos. Em juvenis infectados de *C. macropomum*, Chagas *et al.* (2012), descreveram que em nenhuma das concentrações testadas (2,4,6 e 8mg/L) e em nenhum dos tempos de exposição propostos (30, 60 ou 120 minutos) o tratamento contra helmintos monogenóides com NaCl surtiu efeito.

2.3.4 Formol 4%

O formaldeído (H₂CO) é um gás incolor, inflamável e com forte odor. É produzido a partir do metanol. Em sua forma líquida, misturado à água e álcool, é denominado formalina ou formol, com concentração de 37 a 50% de formaldeído. O formol pode ser usado como tratamento profilático ou medicamentoso, para tal, é administrado sob a forma de banhos terapêuticos, com diferentes tempos de exposição e concentrações que variam de acordo com a espécie de peixe e o tipo de patógeno que se pretende tratar. A formalina pode ser eficaz contra protozoários, fungos e bactérias, embora possa também agredir as brânquias dos peixes, de acordo com a concentração, tempo de exposição e a espécie hospedeira. Sua toxicidade aumenta com a temperatura e o pH, o que limita seu uso em regiões de que possuem temperatura e acidez da água elevadas (XU e ROGERS, 1993; NOGA, 1996; MARTINS, 2004; SCHALCH; TAVARES-DIAS e ONAKA, 2009).

No tratamento profilático, o formol pode ser usado como desinfetante dos fômites, incubadoras e também na desinfecção da superfície dos ovos embrionados. (ARAÚJO *et al.*, 2004; BARNES *et al.*, 2005; PAVANELLI; EIRAS e TAKEMOTO, 2008; TAVARES-DIAS *et al.*, 2013). O estudo para testar eficiência do formol no tratamento de fungos foi realizado por Corrêa *et al.* (2013), que obtiveram *in vitro*, a redução do crescimento micelial do fungo

Saprolegnia spp., nas concentrações de 1.000, 5.000 e 10.000ppm, com temperaturas de cultivo variando de 25 à 45 °C. Contudo, há indícios de que temperaturas elevadas potencializam os efeitos tóxicos do formol (MARTINS, 2004). A avaliação *in vivo* do efeito do formol no mesmo agente fúngico, foi testada por Marking; Rach e Schreier (1994), com a concentração de 1.000 ppm por um período de exposição de 15, 30 e 60 minutos, e observaram que os banhos causam uma redução na infestação permitindo maiores taxas de eclosão. Cabe ressaltar que os ovos embrionados de truta arco-íris, são incubados a uma temperatura média de 10 °C (MACHADO; RIGOLINO e TABATA, 2007).

A contestação do estresse causado pelo uso do formol em peixes para o controle profilático já foi discutido principalmente pelo pouco conhecimento dos seus efeitos prejudiciais (KAKUTA *et al.*, 1991). Porém o uso de formol em juvenis de *C. macropomum*, foi testado em concentração de 100 e 150 ppm em banhos de 30, 60 e 120 minutos, e 200 e 250 ppm por até 30 minutos, com uma temperatura em torno de 27 °C, e constatam que o uso deste agente profilático não comprometeu a homeostasia destes peixes (ARAÚJO *et al.*, 2004), ou seja, não elevando nível de estresse.

Cabe ressaltar que a utilização do formol pode causar danos à saúde humana, como irritação nas mucosas, náusea, problemas respiratórios e até câncer (GUPTA *et al.*, 1982; MACAGNAN *et al.*, 2014; BELVISO, 2015; ANVISA, 2015). Por isso sua aplicação deve ser feita de forma cautelosa e com a utilização de equipamentos de proteção individual, como máscaras, luvas, botas de borracha, óculos e etc.

2.3.5 Oxitetraciclina

Pertence ao grupo das tetraciclina, é um antibiótico, bacteriostático de largo espectro, apresentado em forma de pó solúvel, atua tanto em bactérias gram-negativas como gram-positivas, ao se ligar na subunidade 30S dos ribossomos das bactérias impede a replicação do DNA e o crescimento delas. Devido a diferenças estruturais entre os ribossomos das bactérias e o das células dos eucariotos, esta pode ser considerada uma substância segura (STRATTON, 1996; ROMERO *et al.*, 2012). Apesar da falta de regulamentação, é amplamente usada na piscicultura continental brasileira (BORGHETTI *et al.*, 2007; CRUZ, 2006; DELÉPÉE e POULIQUEN, 2003).

Pode ser administrada pelas vias; oral, quando adicionada à ração; injetável, quando diluído e aplicado por seringas, ou ainda através de banhos, onde a substância é adicionada em um tanque com água onde estão os animais. (GASTALHO; DA SILVA e RAMOS, 2014).

Estudos referentes a sua concentração letal 50% (LC₅₀) frente a uma espécie indicadora ambiental (*Phollocerus caudimaculatus*) apontam que, respeitando a concentração indicada para atuar como bacteriostática (0,1 mg/L), banhos com oxitetraciclina são considerados seguros para espécies não alvo, e que os parâmetros da água durante o estudo não foram limitantes para a avaliação e se encontram dentro do indicado para a criação de tambaquis, por exemplo, (CRUZ *et al.*, 2006). Outros autores como Carraschi *et al.* (2010), apontaram valores de toxicidade aguda em pacus somente quando expostos a concentrações acima de 7,5 mg/L, e relataram que a oxitetraciclina reduz os níveis de O₂D na água. No mesmo estudo foi avaliada a eficiência do produto quando administrado via oral, contendo 170 mg de oxitetraciclina por Kg de ração, e apesar do baixo consumo da ração fornecida, esta foi capaz de conter 50% da infecção por *Aeromonas hydrophila*. Contudo, talvez não seja essa a maneira mais eficiente de se utilizar o produto, pois os animais doentes podem apresentar como sinal clínico a inapetência, além do meio fornecido apresentar baixa aceitabilidade (RIGOS *et al.*, 1999; TAVARES-DIAS *et al.*, 2013) o que reduziria a ingesta da ração pelos animais..

Os estudos apresentados apontam que a oxitetraciclina, pode ser considerado um bacteriostático seguro para piscicultura, contudo medidas legais quanto à regulamentação deste e de demais produtos utilizados devem ser tomadas. O uso indevido, sem a supervisão de um profissional capacitado pode trazer grandes prejuízos ao meio ambiente e à saúde do ser humano. Extensas revisões sobre a utilização da oxitetraciclina como profilático estão disponíveis, mas não há um consenso geral com relação aos aspectos negativos de tal prática (LEITE, 2002).

2.3.6 Iodo

O iodo apresenta ação germicida contra bactérias gram negativas e gram positivas, fungos, vírus, protozoários e esporos. (BOVO *et al.*, 2005; FUANGSAWAT *et al.* 2011). Pode ser utilizado como agente desinfetante nas formas de: Iodóforo, por exemplo, o PVP-I (Iodopovidona: iodo + povidona 10%, com 1% de iodo livre) ou ainda como tintura de iodo 2%. A diferença deles é que no PVP-I, o iodo é liberado gradativamente e tem sua ação prolongada enquanto que a tintura age mais rapidamente. Em piscicultura já existem produtos a base de iodo que são específicos para desinfecção de ovos como o Buffodine[®] e o Actomar K30[®].

A ampla utilização de soluções a base de iodo, vão desde indicações para o uso na desinfecção da água e pessoal, quanto para os ovos embrionados dos peixes (BERGH *et al.*, 1996; DOS SANTOS e AFONSO, 2011; FUANSAWAT *et al.*, 2011; KATHARIOS *et al.*, 2007; NOGA, 2010; PAVANELLI; EIRAS e TAKEMOTO, 2008).

A concentração ideal da solução a base de iodo para utilização na desinfecção pessoal é de 200 mg/L (PAVANELLI; EIRAS e TAKEMOTO, 2008). No entanto para a desinfecção de ovos embrionados, estudos apontam que utilizando 100 mg/L do composto a base de iodo (1%) são eficientes e não alteram significativamente a eclosão dos embriões quando os banhos forem de até 10 minutos em *Gadus morhua* (OVERTON; BRUUN e GALSGAARD, 2010). Por outro lado, Corrêa *et al* (2013) testaram *in vitro*, a eficiência de diferentes concentrações de PVP-I (de 10 a 10.000 ppm) para controle de crescimento micelial de amostras fúngicas de *Saprolegniaspp.*e verificaram que em nenhuma das concentrações testadas, o PVP-I foi eficiente no controle do fungo, cabe ressaltar que, nesse estudo foi considerada apenas o crescimento micelial como parâmetro sobre a eficiência da substância testada.

Como desinfetante de ovos, o iodo pode apresentar diferentes resultados devido à concentração usada, ao pH da água, à espécie envolvida e também ao tempo de exposição (ALDERMAN, 1984). O pH tem influencia, pois abaixo de 6, causa aumento dos efeitos tóxicos do iodo e acima de 8, apresenta redução na capacidade de desinfecção (PAVANELLI; EIRAS e TAKEMOTO, 2008). Se essas variáveis não forem consideradas, efeitos adversos poderão ocorrer quando esta substância for usada. Da mesma forma, quando utilizada para desinfetar as mãos, este poderia ocasionar alergias e irritações, dependendo da concentração utilizada (TAVARES-DIAS *et al.*, 2013).

3 ARTIGO

3.1 Introdução

O constante crescimento da piscicultura nacional tem sido impulsionado também pelas pesquisas que auxiliam na consolidação do setor (BRASIL, 2012; GASTALHO; DA SILVA e RAMOS, 2014). Das espécies nativas comerciais, o tambaqui *Colossoma macropomum*, é a mais produzida (BRASIL, 2012), devido a suas características de cultivo e aceitabilidade pelo consumidor (IZEL e MELO, 2004; MELO; IZEL e RODRIGUES, 2001;). O manejo profilático mostra relevância principalmente com a intensificação da cadeia produtiva, pois assegura a produtividade e garante alimentos saudáveis e seguros para a população (TAVARES-DIAS *et al.*, 2013; TAVECHIO; GUIDELLI e PORTZ, 2009).

No Brasil ainda há uma carência na legislação específica para os tipos de tratamentos profiláticos que podem ser utilizados na piscicultura (CAMPOS, 2005). Mesmo com dificuldades, os estudos realizados com manejos profiláticas da produção piscícola nacional vêm mostrando maior eficácia do que técnicas importadas (LEITE, 2002). Um manejo que ganha destaque na prevenção de epizootias é a desinfecção de ovos embrionados, que possibilita a redução da carga patogênica na superfície dos mesmos (MURGAS *et al.*, 2012; PÁDUA e FILHO, 2012).

As recomendações para a utilização de agentes profiláticos são muito variadas, pois dependem de fatores como a espécie produzida, a qualidade da água, o tempo de exposição e a concentração do meio. Estudos com cloreto de sódio (30 g/L) e formalina (1.5 ml/L) foram realizados como parte do manejo profilático em ovos embrionado de *Oncorhynchus mykiss* por Schereier, Rach e Howe (1996), e banhos de até 15 minutos foram eficientes no controle fúngico de *Saprolegnia spp.* Embora sem eficácia fúngica, o iodo é amplamente utilizado como bactericida em ovos embrionados de *Gadus morhua L.*, *Pagrus pagrus* e *Diplodus sargus sargus*, nas concentração de 50 até 150 mg/L por 10 minutos (KATHARIUS *et al.*, 2007; OVERTON; BRUUN e DALSGAARD, 2010). Outro agente muito utilizado no controle de bactérias é a oxitetraciclina, porém suas recomendações sugerem que a concentração do meio não ultrapasse 0,1 mg/L, pois pode se tornar tóxica além de reduzir os níveis de oxigênio dissolvido na água (CRUZ *et al.*, 2006).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos agentes profiláticos (cloreto de sódio, formol, oxitetraciclina e iodo) sobre a taxa de eclosão de ovos embrionados de *C. macropomum* em diferentes concentrações.

3.2 Materiais e métodos

O presente experimento foi realizado na piscicultura Boa Esperança no Estado de Rondônia, localizada no município de Pimenta Bueno, durante o período reprodutivo de 2015 entre os meses de janeiro e fevereiro.

3.2.1 Manejo sanitário e qualidade da água

Todos os técnicos e colaboradores deste experimento, utilizaram procedimentos higiênico sanitário pessoal adequado para realização do manejo com os reprodutores e manipulação dos oócitos e ovos embrionados.

Os equipamentos utilizados no presente experimento foram higienizados adequadamente seguindo o manual de boas práticas de manejo, e para manipulação dos ovos embrionados e aplicação dos tratamentos testados o material utilizado era novo e descartável.

Os parâmetros da qualidade da água foram aferidos no início (momento da fertilização), durante a aplicação dos tratamentos e no final (após a eclosão dos embriões) do experimento. Através da utilização de um oxímetro digital YSI[®] 55 (Pro 20 - YSI *Sistemy, Yellow Spring* – OH – USA) e fitas medidoras de pH (*pH Indicator Strips, Merck* – Alemanha), foram coletadas a temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água das caixas.

3.2.2 Obtenção dos ovos embrionados

A obtenção dos ovos embrionados, foi através da estimulação hormonal de três fêmeas de *C. macropomum* com Extrato de Hipófise de Carpa (5,5 mg/Kg de peso corporal), Transcorridas 280 horas/grau da aplicação total do hormônio, elas foram extrusadas através de uma leve massagem abdominal no sentido crânio-caudal e seus oócitos armazenados em bacias individuais para posteriormente serem fecundados. Três machos da mesma espécie foram induzidos a espermiar com hormônio sintético (Ovopel – 2,0 mg/Kg de peso vivo) e, transcorridas 280 horas/grau após a aplicação hormonal, o líquido seminal foi coletado e armazenado utilizando seringas descartáveis de 5 ml.

Após a coleta dos gametas, um *pool* de espermatozoides e oócitos foi realizado para eliminar o efeito individual. Em seguida, a fecundação foi realizada a seco, ou seja, ocorreu a homogeneização dos gametas e posteriormente a adição de água. Decorrente à fertilização, 51 alíquotas de 50 mL contendo aproximadamente 1.280 ± 40 oócitos fertilizados, foram separadas individualmente e distribuídas aleatoriamente, em incubadoras experimentais identificadas alojadas em caixas d'águas de 1000 L. As incubadoras foram confeccionadas com placas de isopor e peneiras plásticas, que se mantinham no nível d'água. Destas foram contabilizados e separados cem ovos viáveis para cada um dos tratamentos a seguir.

3.2.3 Tratamentos e execução

A escolha dos agentes profiláticos e as concentrações utilizadas foram baseadas em recomendações encontradas na literatura (KATHARIUS *et al.*, 2007; OVERTON; BRUUN e GALSGAARD, 2010; PAVANELLI; EIRAS e TAKEMOTO, 2008), desta maneira, foram testados em ovos de *C. macropomum* níveis acima e abaixo da posologia recomendada para os demais teleósteos.

O momento da aplicação dos tratamentos foi oito horas após a fertilização, neste momento o embrião já está em fase de fechamento do blastóporo e início da diferenciação entre cabeça e cauda, sendo considerada a melhor fase para se aplicar os tratamentos profiláticos (KATHARIOS *et al.*, 2007). A aplicação dos banhos foi realizada em recipientes plásticos de volume controlado, neles foi feita a imersão das amostras. Cada uma possuía cem ovos viáveis e os respectivos tratamentos, para cada amostra foram feitas três repetições. O tempo do banho de cada tratamento foi de 10 minutos. Após cada banho os ovos foram lavados com a água da incubadora, para remover possíveis resíduos remanescentes dos agentes. Três amostras não receberam a aplicação de tratamentos profiláticos, porém foram submetidas ao manejo com água da incubação pelo mesmo tempo das outras, este foi considerado o tratamento controle. Após, todas foram devolvidas para as suas respectivas incubadoras até o momento previsto para eclosão.

Tabela 1 – Agentes profiláticos e concentrações utilizados em banhos para de ovos embrionados de *C. macropomum*

Agentes Patogênicos	Tratamento	Concentração
Controle	Ctrl	Água
Oxitetraciclina	T1C1	10 mg/L
	T1C2	25 mg/L
	T1C3	50 mg/L
	T1C4	100 mg/L
Cloreto de Sódio	T2C1	2,5 g/L
	T2C2	5,0 g/L
	T2C3	7,5 g/L
	T2C4	10,0 g/L
Formol 4%	T3C1	0,10 ml/L
	T3C2	0,12 ml/L
	T3C3	0,16 ml/L
	T3C4	0,25 ml/L
Iodo 2%	T4C1	25 mg/L
	T4C2	50 mg/L
	T4C3	100 mg/L
	T4C4	200 mg/L

3.2.4 Parâmetros avaliados

Para avaliar o efeito da ação profilática dos agentes e suas concentrações, a taxa de eclosão dos ovos embrionados foi avaliada. Após dez horas da aplicação dos tratamentos, as incubadoras foram observadas e foi realizada a contagem dos embriões que não eclodiram e foi calculada a porcentagem de embriões que se desenvolveram e eclodiram.

3.2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo hierárquico com 4 agentes profiláticos e 4 concentrações e 3 repetições de cada tratamento. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e teste F, com auxílio do procedimento "general linear model" (GLM). Quando detectadas diferenças, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os agentes profiláticos com maior taxa de eclosão foram submetidos à análise de variância e teste F para testar possíveis diferenças entre as concentrações. Para

realizar as análises foi utilizado o programa estatístico SAS, versão 9.0 (SAS, 2002). Foi adotado 5% como o nível de significância máximo das análises.

3.3 Resultados

Os parâmetros qualitativos da água durante a execução do experimento mantiveram-se nos padrões esperados, a temperatura foi de $27,0 \pm 1,0$ °C, o oxigênio dissolvido foi de $7,0 \pm 0,5$ mg/L e o pH foi de 6,5. A taxa de eclosão dos embriões submetidos aos banhos profiláticos com os agentes: oxitetraciclina (T1); cloreto de sódio (T2) e formalina (T3), não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$) com relação ao controle (Ctrl), e suas taxas de eclosão foram de: 92,25; 92,25; 93,83 e 94,33%, respectivamente. A utilização de banhos profiláticos com o iodo (T4), causou uma redução na taxa de eclosão dos embriões (21,50%), essa diferença foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$) com relação aos demais resultados.

As concentrações utilizadas não se mostraram diferentes estatisticamente ($P > 0,05$) entre os tratamentos: T1; T2 e T3. Para o T4, houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre as concentrações de 25,0(C1), 50,0(C2) e 100,0(C3) mg/L que apresentaram taxas de eclosão inferiores a taxa obtida na concentração de 200,0 (C4) mg/L, que foi de 35,33%. Os dados descritos acima podem ser observados na Figura 1.

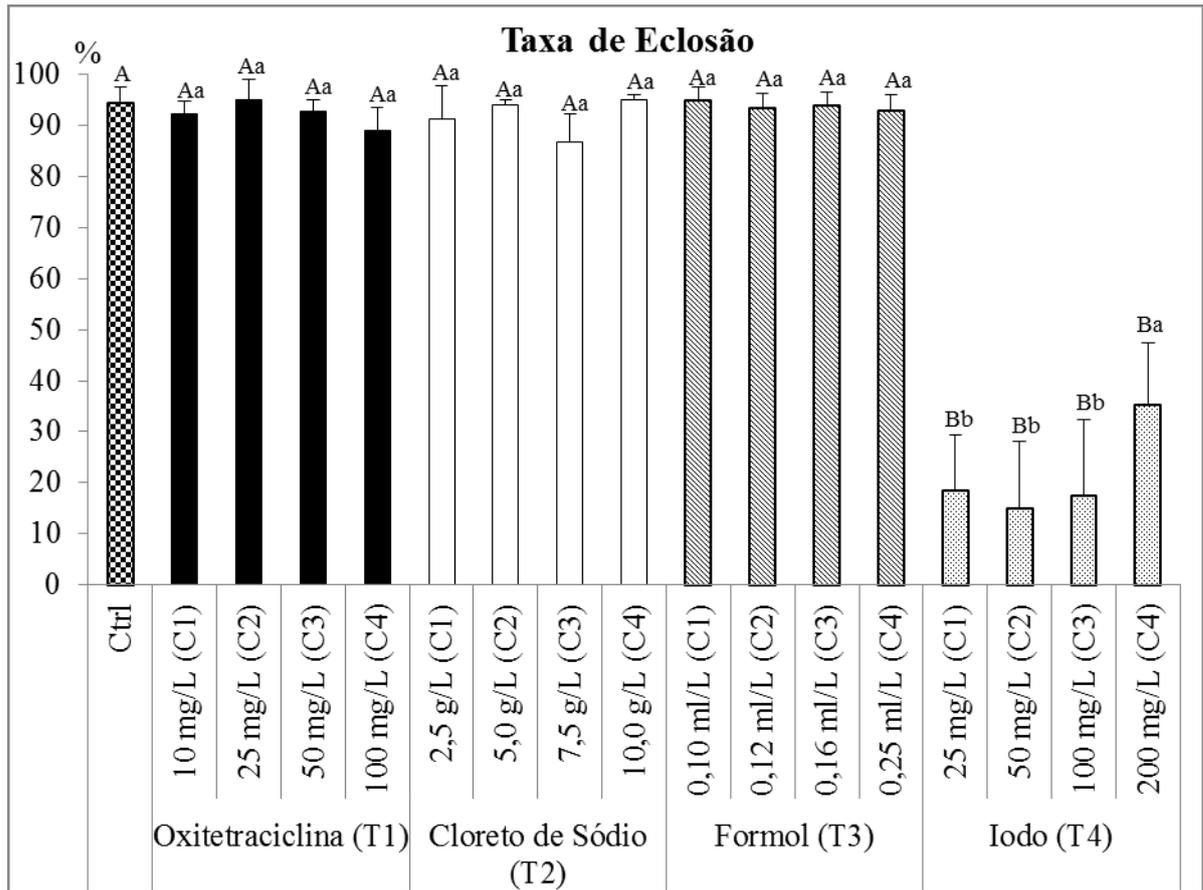


Figura 1 – Porcentagem da taxa de eclosão obtida para o controle e os tratamentos utilizados no manejo profilático de *C. macropomum*. Letras maiúsculas diferem entre os tratamentos e controle, e minúsculas diferem entre as concentrações do agente patogênico.

3.4 Discussão

O manejo profilático em ovos embrionados já é aplicado devido a sua importância no controle de epizootias (KATHARIOS *et al.*, 2007; OVERTON; BRUUN e GALSGAARD 2010; MURGAS *et al.*, 2012), contudo os agentes comumente utilizados podem causar danos aos embriões se forem administrados de forma errônea. Cabe ainda ressaltar que o fator qualidade de água (PAVANELLI; EIRAS e TAKEMOTO, 2008; SCHALCH; TAVARES-DIAS e ONAKA, 2009), pode influenciar negativamente no tratamento profilático. A água utilizada no presente experimento possivelmente não foi um fator limitante para influenciar negativamente a eclosão dos ovos. Pois é de conhecimento que os parâmetros de qualidade da água necessários para reprodução da espécie em estudo, o *C. macropomum*, é de 26 a 29 °C, pH de 6,5 a 8,0 e oxigênio dissolvido (O₂D) ≥ 5,0 mg/L (MURGAS *et al.*, 2012; STREIT JR. *et al.*, 2012).

A influência de altas dosagens de oxitetraciclina pode causar redução dos níveis de O₂D da água (CRUZ, 2006). O cloreto de sódio pode causar efeitos prejudiciais a homeostase

se usado em concentrações inadequadas (KUBITZA, 2007). A utilização do formol em temperaturas elevadas na água, pode acarretar no aumento de sua toxidez e causar danos (SCHALCH; TAVARES-DIAS e ONAKA, 2009). E o iodo, pode ter a eficácia reduzida se aplicado em água com pH superiores a 8,0 e pode ter a toxidez potencializada em pH inferior a 6,0 (PAVANELLI; EIRAS e TAKEMOTO, 2008).

A utilização dos agentes oxitetraciclina (OXT), cloreto de sódio (NaCl) e formol no manejo profilático em ovos embrionados não afetou as taxas de eclosão do presente experimento, e os tratamentos apresentaram taxas acima de 92%, e foram semelhantes ao controle (94,33%). Em ovos embrionados de *Oncorhynchus mykiss*, o NaCl e o formol foram testados, para verificar o efeitos dos agentes na profilaxia e a influencia na eclosão dos embriões, e as melhores concentrações obtidas foram de 30 g/L (NaCl) e 1.5 ml/L (formol) para banhos de 15 minutos, com taxas de eclosão de 68,5 e 73,5%, respectivamente. Vale ressaltar que no tratamento controle a taxa de fertilização foi inferior a 30% (SCHREIER; RACH e HOWE, 1995). Para a utilização da OXT em banhos profiláticos de ovos embrionados de peixes, as informações na literatura são escassas, é possível que este seja um dos primeiros trabalhos testando o agente, embora existam recomendações do seu uso para adultos (GASTALHO; DA SILVA e RAMOS, 2014).

O iodo provocou uma queda acentuada de cerca de 80% na taxa de eclosão de *C. macropomum*, independentemente da concentração utilizada, em média apenas 21,50% de eclosão. Em algumas espécies como *Diplodus sargus sargus*, o tratamento com iodo é prejudicial se a concentração for elevada. Em concentrações entre 25 e 50 mg/L a taxa de eclosão foi superior a 95%, porém com o aumento da concentração para 100 mg/L a taxa de eclosão caiu para 35%, com banhos de 5 minutos (KATHARIOS *et al.*, 2007). De maneira semelhante, em *Pagrus pagrus* a taxa de eclosão caiu de 95% para 75% com o aumento da concentração de iodo nos tratamentos profiláticos que utilizaram 50 mg/L e 100 mg/L, respectivamente, em banho de 5 minutos (KATHARIOS *et al.*, 2007). Contudo, essas informações contrariam os resultados obtidos no presente trabalho, pois com a concentração máxima testada, ocorreu um aumento significativo da taxa de eclosão, mas ainda com valor inferior aos dos demais tratamentos e ao grupo controle e não compatíveis com as exigências da cadeia piscícola. Cabe ressaltar que as espécies supracitadas são marinhas, e seus desenvolvimentos embrionários são prolongados quando comparados a espécie estudada nesse trabalho.

A fisiologia embrionária é algo que se deve levar em conta para realização do tratamento profilático, pois o córion tem diferentes espessuras que podem ser alteradas pelo

uso de agentes profiláticos, por exemplo, o iodo (OVERTON, BRUUN e DALSGAARD, 2010). Por isso, estudos sugerem que a utilização deste agente bactericida em ovos embrionados, seja em banhos mais concentrados do que prolongados (JODUN e MILLARD, 2001). Já a utilização do formol pode ser contrária, utilizando concentrações menores com múltiplos banhos durante a incubação (SUDOVA *et al.*, 2007). A utilização do NaCl como agente profilático em ovos embrionados é amplamente recomendado, nas concentrações ideais para cada espécie (MARKING, RACH e SCHEREIER, 1994; KUBITZA, 2007)

A recomendação por um manejo sanitário adequado no momento da reprodução e larvicultura, é fundamental para a obtenção de sucesso nesta fase (MURGAS *et al.*, 2012; TAVARES-DIAS *et al.*, 2013), o manejo preventivo utilizado no presente experimento pode ter feito a diferença nos resultados obtidos, pois mesmo não passando pelos tratamentos profiláticos a taxa de eclosão do controle foi de 94,33%.

3.5 Conclusões

O manejo profilático, da forma como foi testado mostrou que a oxitetraciclina, o cloreto de sódio e o formol podem ser usados, sem causar redução na taxa de eclosão dos embriões de *C. macropomum*. Já o iodo deve ser submetido a novos testes com tempos e concentrações diferentes.

3.6 Referências

ALDERMAN, D. J. The toxicity of iodophors to salmonid eggs. **Aquaculture**, Oxford, v.40, n.1, p.7-16, 1984.

ARAÚJO, L. D. *et al.* Efeito de banhos terapêuticos com formalina sobre indicadores de estresse em tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 217-212, mar. 2004.

BRASIL. Portaria nº 395, de 24 de outubro de 2014. Submete à consulta pública, pelo prazo de 30 (trinta) dias a contar da data de publicação desta Portaria, o projeto de Instrução Normativa que institui o Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos de Cultivo - "Aqüicultura com Sanidade". **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 27 out. 2014. Seção 1, p. 24.

CRUZ, C. *et al.*, Toxicidade aguda do permanganato de potássio e da oxitetraciclina para o guaru (*Phallocerus caudimaculatus*) utilizado como bioindicador. **Resumo expandido 328/382**, Jaboticabal 2006

GASTALHO, S.; DA SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, Santiago de Compostela, vol. 3, n. 1, pp. 29-45. 2014.

IZEL, A. C. U.; MELO, L. 2004. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques escavados no Estado do Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental**. Documento 32. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 19p.

JODUN, W. A.; MILLARD, M. J. Effect of iodophor concentration and duration of exposure during water hardening on survival of Atlantic salmon eggs. **North American Journal of Aquaculture**, Philadelphia, v. 63, n. 3, p. 229-233, 2001.

KATHARIOS, P. *et al.* Comparison of iodine and glutaraldehyde as surface disinfectants for red porgy (*Pagrus pagrus*) and white sea bream (*Diplodus sargus sargus*) eggs. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 38, p. 527-536, mar. 2007.

KUBITZA, F. A versatilidade do sal na piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, Tocantins, n. 103, v. 17, p. 14-23, set/out. 2007.

LEITE, C. Noções aplicadas sobre manejo higiênico-sanitário em piscicultura comercial. **Boletim Técnico**, Universidade Federal de Lavras . 2002.

MARKING, L. L.; RACH, J. J.; SCHREIER, T. M. American fisheries society evaluation of antifungal agents for fish culture. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 56, n. 4, p. 225-231, 1994.

MELO, L.; 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**, Documento 18. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 18p.

MURGAS¹, L. D. S., *et al.* Eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Ciência Animal**, Lavras, v. 22, n. 1, p.197-206, 2012.

OVERTON, J. L.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I. Chemical surface disinfection of eggs of Baltic cod, *Gadus morthua* L. **Journal of fish diseases**, Denmark, v. 33, p. 707-716, 2010.

PÁDUA, S.B.M.; FILHO, R. N. Alevinos saudáveis. **Panorama da Aquicultura**, Tocantins, n. 134, v. 22, p. 30-37, nov./dez. 2012

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C. TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes**: 3. ed. Maringá: 2008. 311 p.

SCHALCH; TAVARES-DIAS; ONAKA Principais métodos terapêuticos para peixes de cultivo In **Manejo e sanidade de Peixes**. Amapá: Embrapa, 2009. cap.22, p575-601.

SCHREIER, T. M.; RACH, J.J.; HOWE, G. E. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. **Aquaculture**, v. 140, n. 4, p. 323-331, 1996.

STREIT JR. D.P. *et al.* Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui. Documento 212. **Embrapa**, Amapá, v 29, 2012.

TAVARES-DIAS, M. *et al* Sanidade do tambaqui *Colossoma macropomum* nas fases de larvicultura e alevinagem. **Embrapa** Amapá;: Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Pesquisas da Amazônia, 2013. 42 p. (**Embrapa Amapá. Documentos 78**)

TAVECHIO, W.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo v. 35, n. 2, p. 335-41, 2009.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A possibilidade de utilização do manejo profilático em ovos embrionados de *Colossoma macropomum* pode ser uma alternativa no controle de patógenos decorrentes da incubação. Atualmente, esse manejo profilático é recomendado como sendo uma boa prática de manejo.

Os agentes estudados neste trabalho são frequentemente utilizados na piscicultura e possuem diferentes características. A oxitetraciclina, o cloreto de sódio e o formol, nas condições estudadas neste experimento, mostraram-se seguros, por não causar redução na eclosão dos embriões.

Porém para a utilização segura do iodo como agente profilático em ovos embrionados ainda é necessário definir as concentrações e os tempos de exposição adequados, quando se pretende tratar ovos embrionados.

O manejo higiênico sanitário dos colaboradores, das estruturas e dos fômites, além da qualidade da água são de extrema relevância para garantir uma produção segura na cadeia piscícola.

REFERÊNCIAS

- A. OSTRENSKY, J. R. BORGHETTI E D. SOTO. Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil. **Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais**, Curitiba: 2007. 271 p. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/fi/document/aquaculture/sect_study_brazil.pdf > Acesso em 17 jun 2015
- ALDERMAN, D. J. The toxicity of iodophors to salmonid eggs. **Aquaculture**, Oxford, v.40, n.1, p.7-16, 1984.
- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.2, p.166-172, 2003.
- ARAÚJO, C. S. O. *et al.* Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: TAVARES-DIAS, M. (Org) **Manejo e sanidade de Peixes**. Amapá: EMBRAPA, 2009. Cap. 16, p.389-424.
- ARAÚJO, L. D. *et al.* Efeito de banhos terapêuticos com formalina sobre indicadores de estresse em tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 217-212, mar. 2004.
- BARNES, M. E. *et al.* Bacterial number from landlocked fall Chinook salmon eyed eggs subjected to various formalin treatments as determined by scanning electron microscopy and bacteriological culture methods. **North American Journal of Aquaculture**. Philadelphia, v. 67, n. 1, p. 23-33, 2005.
- BELVISO, T. I. Os perigos do uso inadequado do formol na estética capilar. **RevInter Revista de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo v. 4, n. 1, p. 74-81, fev. 2011.
- BERGH Ø. & JELMERT A. Iodophor disinfection of eggs of Atlantic halibut. **Journal of Aquatic Animal Health** 8, 135–145. 1996.
- BRASIL. Portaria nº 395, de 24 de outubro de 2014. Submete à consulta pública, pelo prazo de 30 (trinta) dias a contar da data de publicação desta Portaria, o projeto de Instrução Normativa que institui o Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos de Cultivo - “Aquicultura com Sanidade”. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 27 out. 2014. Seção 1, p. 24.
- BRUM, C. D. **Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 2003. 76 f. Dissertação (Mestrado em aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, UNESP, Jaboticabal, 2003.

CARMICHAEL, G. J. *et al.* Confinement and water quality induced stress in largemouth bass. **Transactions of the American Fisheries Society**, Abingdon, v. 113, n. 6, p. 767-777, 1984.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. “Stress” e crescimento de peixes em piscicultura intensiva. In: **Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes 3**, 1999. Campinas, **Anais...** Campinas: v. 3, p. 25-40, 1999.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, Chilchester v. 32, n. 4, p. 297-304, Apr 2001.

CARRASCHI, S. P. **Ecotoxicidade e eficácia da oxitetraciclina e do florfenicol contra infecção experimental por *Aeromonas hydrophila* e aspectos histopatológicos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2010. 61 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/86749>> Acesso em: 14 jun 2015.

CHAGAS, E. C. *et al.* Suplementos dietéticos na manutenção da saúde em peixes. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). **Manejo e sanidade de Peixes**. Amapá: EMBRAPA, 2009. Cap.7. Tavares-Dias, M 2009.

CHAGAS, E. C., & VAL, A. L.. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 397-402, 2003.

CRUZ, C. *et al.*, Toxicidade aguda do permanganato de potássio e da oxitetraciclina para o guaru (*Phallocerus caudimaculatus*) utilizado como bioindicador. **Resumo expandido 328/382**, Jaboticabal 2006

DA SILVA CAMARGO, A. C. *et al.* Níveis de energia metabolizável para tambaqui (*Colossoma macropomum*) dos 30 aos 180 gramas de peso vivo. 1. Composição das carcaças. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa v. 27, n. 3, p. 409-415, 1998.

DAIRIKI, J. K.; SILVA, T. B. A. Revisão de literatura: Exigências nutricionais do tambaqui – Compilações de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. **Embrapa Amazônia Ocidental, Documentos**, 2011, Manaus, Documentos;91, p. 44. Serie III. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/931300>>. Acesso em: 17 jun. 2015

DE MACEDO, C. R., DA LUZ, L. F. M., & DE LIMA, A. C. S. Influência de diferentes concentrações de nacl em embriões e alevinos de teleósteos-revisão. **Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**. Recife. 2013

DE MOURA MUNIZ, J. A. S.; DE ALMEIDA CATANHO, M. T. J. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo v. 34, n. 2, p. 205-211, 2008.

DE QUEIROZ, J. F. Boas práticas aquícolas (BPA) em viveiros garantem sucesso da produção. **Visão Agrícola, Circular Técnica**, n. 11 p. 36-39, 2013.

DE QUEIROZ, J. F.; BOEIRA, R. C. Calagem e controle da acidez dos viveiros de aquicultura. **Embrapa Meio Ambiente, Circular Técnica**, jun/dez 2006.

DELÉPÉE, R. e POULIQUEN, H. Ion-paired solid phase extraction as a sample preparation strategy for the high-performance liquid chromatographic determination of oxytetracycline in the bryophyte *Fontinalis antipyretica*. **Analytica chimica acta**, v. 475, n. 1, p. 117-123, 2003.

DOMINGUES, P. F. **A higiene no processo produtivo.**

DOS SANTOS, V. M.; AFONSO, J.C. Iodo. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v.35, n.4, p. 297-298, nov 2011.

EMATER. Sanidade agropecuária. Disponível em: <<http://www.emater.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=156>>. Acessado em 20 de jun 2015

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira Zootecnia**. Viçosa, v. 37, n. spe, p. 8-14, jun 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982008001300002&lng=en&nrm=iso> .Acesso em: 19 jun. 2015.

FIGUEIREDO, H.C.P.; DE GODOY, D.T.; LEAL, C.G.A. Sanidade aquícola, antibióticos na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, Tocantins, n.105, v. 18, p. 42-49, jan/fev. 2008.

FUANGSAWAT, W.; ABKING, N.; LAWHAVINIT O. Sensitivity comparison of pathogenic aquatic fungal hyphae to sodium chloride, hydrogen peroxide, acetic acid and povidone iodine. **Journal of Natural Science**, Tailândia, v. 45, p. 84-89, 2011.

GALVÃO, I. Módulo de propagação artificial de “tambaqui” (*Colossoma macropomum*) e “pacu” (*C. mitrei*). **Avances em el cultivo de peces del género Colossoma**, 1989.

GASTALHO, S.; DA SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, Santiago de Compostela, vol. 3, n. 1, pp. 29-45. 2014.

GUPTA, K. C.; ULSAMER, A. G.; PREUSS, P. W. Formaldehyde in indoor air: sources and toxicity. **Environment International**, Basel v. 8, n. 1, p. 349-358, 1982.

IZEL, A. C. U.; MELO, L. 2004. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques escavados no Estado do Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental**. Documento 32. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 19p.

JACOMETO, C.B. *et al.* Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.45, p.481-487, 2010.

JODUN, W. A.; MILLARD, M. J. Effect of iodophor concentration and duration of exposure during water hardening on survival of Atlantic salmon eggs. **North American Journal of Aquaculture**, Philadelphia, v. 63, n. 3, p. 229-233, 2001.

JÚNIOR, M. V. V. *et al.* Níveis de proteína bruta para tambaqui (*Colossoma macropomun*), na fase de 30 a 250 gramas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Vicoso, v. 27, n. 3, p. 421-426, 1998.

KATHARIOS, P. *et al.* Comparison of iodine and glutaraldehyde as surface disinfectants for red porgy (*Pagrus pagrus*) and white sea bream (*Diplodus sargus sargus*) eggs. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 38, p. 527-536, mar. 2007.

KUBITZA F. Tambaqui, alimentando com eficiência para reduzir custos. **Panorama da Aquicultura**, Tocantins, n. 129, v. 22, p. 1-7, jan./fev. 2012.

KUBITZA, F. A versatilidade do sal na piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, Tocantins, n. 103, v. 17, p. 14-23, set/out. 2007.

LAURENT, P.; PERRY, F. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. **Journal of cell and Tissue Research**, Heidelberg, v. 259, n. 3, p. 429-442, 1990.

LEITE, C. Noções aplicadas sobre manejo higiênico-sanitário em piscicultura comercial. **Boletim Técnico, UFLA**. 2002.

LEITE, L. V. *et al.* Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo brasileiros de medicina veterinária e zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 2, p. 421-429, 2013

MACAGNAN, K. K.; SARTORI, M. R. K.; DE CASTRO, Fábio Godinho. Sinais e sintomas da toxicidade do formaldeído em usuários de produtos alisantes capilares. **Saúde**, São Paulo, v. 2, n. 4, 2014.

MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F., AZEVEDO H. C. Manejo dos peixes, indução hormonal, coleta e armazenamento do sêmen. **Embrapa**, Aracaju, 2011.

MARKING, L. L.; RACH, J. J.; SCHREIER, T. M. American fisheries society evaluation of antifungal agents for fish culture. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 56, n. 4, p. 225-231, 1994.

MARTINS, M.L. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aqüicultura brasileira In: RANZANI-PAIVA, M.J.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004, p. 357-370.

MELO, L.; 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**, Documento 18. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 18p.

MURGAS¹, L. D. S., *et al.* Eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Ciência Animal**, Lavras, v. 22, n. 1, p.197-206, 2012.

NAKATANI, K. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. UEM :Eletrobrás, 2001. Disponível em: <<http://livros.nupelia.uem.br/ovos-e-larvas/chaves.htm>> Acesso em: 22 de jun 2015.

NOGA, E. J. **Fish disease. 2nd ed.** Hoboken: Wiley- Blackwell, 2010, 536 p. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=M5GZGH3WIEC&oi=fnd&pg=PT14&dq=fish+disease&ots=ja63_P56Vb&sig=TgQCOvD4uG_LCqWadEjQIsoduaE#v=onepage&q=fish%20disease&f=false>. Acesso em 8 de jun de 2015.

NOGA, E.J. **Fish Disease**. Mosby-Year Book, Inc.Oxford: 1996, 376 p.

OBA, E. T.; MARIANO, W. dos S.; SANTOS, LRB dos. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. **Embrapa** Amapá, p. 226-247, 2009.

OLIVEIRA C.G. *et al.* Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **Evolutionary Biology**, New York, v. 11, n. 1, p. 275, 2011.

VERTON, J. L.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I. Chemical surface disinfection of eggs of Baltic cod, *Gadus morthua* L. **Journal of fish diseases**, Denmark, v. 33, p. 707-716, 2010.

PÁDUA, S.B.M., FILHO, R. N. Alévinos saudáveis. **Panorama da Aquicultura**, Tocantins, n. 134. v. 22, p. 30-37, nov./dez. 2012

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C. TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes**: 3. ed. Maringá: EDUEM, 2008. 311 p.

PONZONI, R. W. Genetic improvement effective dissemination: IN: PONZONI, R. W.; ACOSTA, B. O.; PONNIAH, A. G. **Development of aquatic animal genetic improvement and dissemination programs**. Malaysia: Worldfish Center, 2006. p.1-6

RESENDE, E. K.; DE OLIVEIRA, C. A. L.; PUCHNICK, A. Melhoria animal no Brasil: uma visão crítica: palestras. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 8., 2010, Maringá. **Anais...** Maringá: SBMA, 2010.

RIGOS, G., ALEXIS, M. and NENGAS, I., Leaching, palatability and digestibility of oxolinic acid and oxytetracycline in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture research**, Chichester, v.30, p. 1-7, 1999.

RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reprodução e Embriogênese. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C. **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicals de Água Doce**. Jaboticabal : FUNEP/UNESP, 2014. Cap. 13, pag. 265-284.

ROMERO J, FEIJOÓ C, NAVARRETE P. Antibiotics in aquaculture use, abuse and alternatives; In: Carvalho E, editor. **Health and Environment in Aquaculture**. 2012.

SALMITO-VANDERLEY.C. S. B. *et al.* Conservação de gametas e embriões de peixes teleósteos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.184-188, jan./mar. 2015.

SAMPAIO, L.A.; OLIVEIRA, M.; TESSER, M.. Produção de larvas e juvenis do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* submetidos à diferentes frequências alimentares. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 2, 2012.

SAMPAIO, L.A.; TESSER; M. Criação de juvenis de peixe-rei (*Odontesthes argentinensis*) em diferentes taxas de arraçoamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, 2006.

SCHALCH; TAVARES-DIAS; ONAKA Principais métodos terapêuticos para peixes de cultivo In **Manejo e sanidade de Peixes**. Amapá: Embrapa, 2009. cap.22, p575-601.

SCHREIER, T. M.; RACH, J.J.; HOWE, G. E. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. **Aquaculture**, v. 140, n. 4, p. 323-331, 1996.

SOLIS-MURGAS, L. D. *et al.* Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte v. 35, p. 186-91, 2011.

SOUSA, R. G. C.; DE CASTRO, A. L. Adequação do uso da hora-grau (hg) em horas contínuas para a reprodução de tambaqui na região do baixo amazonas. **Scientia Amazonia**, Belém, v. 3, n.1, p.75-80, abr 2014

SOUSA, R. G. C.; DE CASTRO, A. L. **Adequação do uso da hora-grau (hg) em horas contínuas para a reprodução de tambaqui na região do baixo amazonas**. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/261871913> Acesso em 19 jun. 2015.

STRATTON I. V.C. W. Mechanisms of action for anti-microbial agents: general principles and mechanisms for selected classes of antibiotics. In: Lorian V, (ed). **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 4th ed. 1996. P.579–603

STREIT JR, Danilo Pedro et al. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Tailândia v. 41, n. 3, p. 147-153, 2004.

STREIT JR. D.P. *et al.* Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui. Documento 212. **Embrapa**, Amapá, v 29, 2012.

STREIT JUNIOR, D. P. *et al.* As tendências da utilização do extrato de hipófise na reprodução de peixes-Revisão. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia**, Londrina v. 5, n. 2, p. 231-238, 2002.

TAVARES-DIAS, M. *et al* Sanidade do tambaqui *Colossoma macropomum* nas fases de larvicultura e alevinagem. **Embrapa** Amapá;: Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Pesquisas da Amazônia, 2013. 42 p. (**Embrapa Amapá. Documentos 78**)

TAVARES-DIAS, M. *et al.* Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.32, n.4, p.693-698, 2002.

TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. EMBRAPA, 2009.

TAVECHIO, W.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo v. 35, n. 2, p. 335-41, 2009.

VALLADÃO, G. M. R.. **Potencial de óleos essenciais de plantas para o tratamento de enfermidade em peixes**. 2014. 83 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Centro de Aquicultura de Jaboticabal, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/110337>>. Acesso em: 26 de jun de 2015

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; LEAL, M. C. Biologia e Conservação de Espermatozoides. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C. **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. Jaboticabal : FUNEP/UNESP, 2014, Cap. 15, pag. 307-336.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. FAO/CODEVASF/CNPQ, Brasília, 1983. 225 p.

XU, D. E ROGERS, W.A. Formaldehyde residue in striped bass muscle. **Journal of Aquatic Animal Health**, Philadelphia, v. 5, n. 4, p. 306-312, 1993.

ZANIBONI-FILHO, E.; BARBOSA, N.D.C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, v.56, p.655-659, 1996.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER M. Técnicas da reprodução de peixes migradores. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.367-373, jul./set. 2007.

ZARSKI, D. *et al.* Application of ovopel and ovaprim and their combinations in controlled reproduction of two reophilic cyprinid fish species. **Polish Journal of Natural Sciences**, Olsztyn, v. 24, n. 4, p. 235-244, 2009.

ZOAR, Y.; MYLONAS, C.C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. In: WORKSHOP HOSTED, 1999, Amsterdam. **Proceedings**...Amsterdam: Elsevier, p. 99-136. 2001

ANEXOS



Figura 1 – Incubadoras experimentais.



Figura 2 – Caixa d'água utilizada para alocar as incubadoras que receberam os tratamentos profiláticos



Figura 3 – Ovos embrionados não eclodidos (taxa de eclosão)