



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL



**ECOTOXICIDADE E EFICÁCIA DA OXITETRACICLINA E DO FLORFENICOL  
CONTRA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Aeromonas hydrophila* E ASPECTOS  
HISTOPATOLÓGICOS EM PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

**Bióloga:** Silvia Patrícia Carraschi

Dissertação apresentada ao Centro de Aquicultura da Unesp – Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

**Jaboticabal – São Paulo**

**2010**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL



**ECOTOXICIDADE E EFICÁCIA DA OXITETRACICLINA E DO FLORFENICOL  
CONTRA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Aeromonas hydrophila* E ASPECTOS  
HISTOPATOLÓGICOS EM PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

**Bióloga:** Silvia Patrícia Carraschi

**Orientador:** Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto

**Co-orientador:** Prof. Dr. Claudinei da Cruz

Dissertação apresentada ao Centro de Aquicultura da Unesp – Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

**Jaboticabal – São Paulo**

**2010**

*Dedico*

*Aos meus pais, Angela Aparecida Travensolo Carraschi e Clóvis Aparecido Carraschi, que sempre me apoiaram e incentivaram, e pelo esforço e sacrifício intenso para que a realização deste sonho pudesse se tornar realidade. A eles minha eterna gratidão e meu eterno amor...*

*“A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento perdemos também a felicidade.  
A dor é inevitável o sofrimento é opcional.”*

***Carlos Drummond de Andrade***

## **Agradecimentos**

À Deus, por me dar uma segunda chance de concretizar esse sonho; por guiar minhas decisões e me dar saúde para que esse trabalho pudesse ser realizado e finalizado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, pela amizade; compreensão e oportunidade para que eu pudesse realizar esse sonho, e principalmente pela orientação, em que seus ensinamentos sempre foram muito enriquecedores.

Ao meu grande mestre, amigo e eterno “Chefe”, meu Co-orientador Prof. Dr. Claudinei da Cruz, por toda sua incansável presença e paciência com meu eterno nervosismo e minha ansiedade, durante toda essa jornada. Eternamente obrigada “Chefe” pela sua amizade, pelos seus milhões de conselhos; pelas suas boas e sempre pertinentes “brincadeiras” que muito me ensinaram, por muitas vezes enxugar minhas lágrimas nas horas de “desespero”, pelos muitos momentos de gargalhadas e principalmente por todos os ensinamentos a mim concedidos.

Aos meus amigos, irmãos e companheiros de trabalho do grupo NEPEAM, aos alunos: Nayara, Aline, Adilson, Alfredo; aos biólogos: Patrícia, Bárbara, Luis Augusto, Antonio Nader Neto, Natália, Francine, Ana Cristina, Milena, Alison; as veterinárias: Daniela e Gessi e aos funcionários: Alessandro e Ronaldo. O meu eterno obrigada, pela incansável ajuda, paciência e amizade, pois sem eles não teria realizado esse trabalho.

Aos meus amigos do Laborseg, técnicas: Ana Carla, Márcia e Tâmara e a bióloga: Angela, o meu agradecimento por toda ajuda e amizade em toda essa fase da minha vida, por estarem sempre dispostas a auxiliar no que fosse preciso.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do laboratório de Ictiopatologia: mestres: Marcelo, Neida e Wilson, que me ajudaram muito nos experimentos e me auxiliaram com a fase microbiológica do meu projeto. Sem a ajuda e disponibilidade de ambos não teria realizado esse trabalho.

Ao Prof. Oswaldo Durival Rossi Júnior pela disponibilidade de fazer os experimentos de comprovação bioquímica em seu laboratório e pela sua equipe, a Lila, o Pedro, a Regeana e a Bruna pela paciência e ajuda na realização e compreensão dos testes.

À Profa Márcia Machado por permitir que pudessemos realizar a histologia em seu laboratório.

Ao Prof. Flávio Ruas de Moraes por disponibilizar o laboratório para o cultivo das bactérias e por ter aceitado ser da minha banca de qualificação e de defesa, sempre acrescentando conhecimentos pertinentes para a melhoria do trabalho.

Ao Prof. Dr. Robinson Antonio Pitelli por disponibilizar a estrutura do seu laboratório para a realização dos experimentos e por ter aceitado participar da minha banca de qualificação, acrescentando itens essenciais para a melhora do trabalho.

As secretárias do departamento de fitossanidade: Raquel e Isabel pela paciência e disponibilidade sempre em me ajudar.

Aos funcionários do Caunesp, à Silvinha, por ter realizado minhas leituras de amônia; ao Sr. Mauro, Waldecir e Márcio pelas tantas vezes que tiveram que fazer arrasto para pegarem meus peixes; á Fátima e ao David pela paciência por atender tantos telefonemas meus e pela Veralice, meu anjo da guarda, que sempre se dispôs a me ajudar no que fosse preciso. Á Profa Irene Vicentini pela eterna compreensão nas fases mais críticas do meu processo, sempre encontrando uma melhor forma para resolver os obstáculos.

Ás minhas amigas Marita, Bel e Dri que sempre me acompanharam desde o início desse sonho, pela amizade, pela força e pelo incentivo em todas as fases.

Á minha amiga e braço direito Letícia Nociti que sempre esteve disposta a me ajudar no que fosse preciso e pelos bons momentos de risadas e descontração, o que sempre foi indispensável para minimizar meu nervosismo.

Ao meu namorado Cleber Henrique de Oliveira, por sempre me apoiar nos momentos que mais precisei, pela ajuda, amizade, compreensão e amor, o que foi indispensável para a concretização dessa árdua caminhada.

Às minhas irmãs e segunda família moradoras de república Carolina, Lívia e Ana Carla pela paciência, compreensão, ajuda na digitalização dos dados, apoio e principalmente pelas boas risadas, momentos esses que serão eternizados em minha vida.

Ao meu pai Clóvis, minha mãe Angela, meu irmão Maicon, meus avós Geralda, Aurélio, Aurora e Antonio, minhas tias Maria Alice, Mirian, Vera e Vilma, meus tios Antonio e “Ticão”, minhas primas Juliana, Jéssica, Paulo e Libiana, pela confiança em mim depositada e pelo apoio nas horas mais difíceis.

Aos meus amigos da pós- graduação (Taís, Milena, Rosângela, Carla, Mônica, Caio, Matheus, Pastor, Fábio, Piá, Francine, Roberson, Tálita, Patrik, e todos os outros) pelos

incansáveis grupos de trabalho, dias de estudo, e a todos que de alguma maneira contribuíram durante essa caminhada.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado concedida e á FAPESP pelo auxílio ao projeto concedido (proc. nº. 2008/51900-3).

## ÍNDICE

	Pág.
Índice de Tabelas.....	viii
Índice de Figuras.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
<b>1. Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>04</b>
<b>3. Revisão de Literatura.....</b>	<b>05</b>
3.1 <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	05
3.2 Controle de <i>A. hydrophila</i> .....	06
3.2.1 Oxitetraciclina.....	07
3.2.1.1 Controle de bacterioses.....	07
3.2.1.2. Toxicidade e risco ambiental.....	08
3.2.1.3 Alterações Teciduais.....	09
3.2.2 Florfenicol.....	10
3.2.2.1 Controle de bacterioses.....	10
3.2.2.2 Toxicidade e risco ambiental.....	11
3.2.2.3 Alterações Teciduais.....	12
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>13</b>
4.1 Aclimação, testes preliminares de toxicidade aguda e de sensibilidade.....	13
4.2 Testes definitivos de toxicidade aguda dos antibióticos.....	14
4.3 Risco Ambiental.....	14
4.4 Técnica de indução de infecção experimental com <i>Aeromonas hydrophila</i> em pacu.....	15
4.5 Variáveis de qualidade de água.....	17
4.6 Reisolamento de <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	17
4.7 Tratamento de pacus infectados com <i>A. hydrophila</i> com OTC.....	19
4.8 Tratamento de pacus infectados com <i>A. hydrophila</i> com FFC .....	20
4.9 Histopatologia de brânquia, fígado, rim e pele de pacu.....	21
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>

5.1 Toxicidade aguda e risco ambiental.....	22
5.2 Variáveis de qualidade de água durante os testes de toxicidade aguda.....	24
5.3 Reisolamento de <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	26
5.4 Eficácia da OTC e do FFC no controle de <i>A. hydrophila</i> .....	26
5.5 Variáveis de qualidade de água durante tratamento com OTC e FFC.....	31
5.6 Histopatologia de pacu após tratamento de <i>A. hydrophila</i> com OTC e com FFC.....	34
5.6.1 Pele .....	34
5.6.2 Brânquia.....	38
5.6.3 Fígado.....	42
5.6.4 Rim.....	44
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>

**ÍNDICE DE TABELA**

<b>Tabela 1.</b> Classes de risco ambiental de compostos tóxicos de acordo com os valores calculados do quociente Q (USEPA, 1987).....	14
<b>Tabela 2.</b> Sinais clínicos observados nos exemplares de pacu após 24 horas de infecção experimental por <i>A. hydrophila</i> .....	16
<b>Tabela 3.</b> Classificação da OTC e do FFC pelo risco de intoxicação ambiental para o pacu.....	24
<b>Tabela 4.</b> Sinais clínicos remanescentes causados por <i>A. hydrophila</i> em pacus após tratamento com OTC ou FFC.....	27
<b>Tabela 5.</b> Valores médios das variáveis de qualidade de água durante tratamento com OTC.....	32
<b>Tabela 6.</b> Valores médios das variáveis de qualidade de água durante tratamento com FFC.....	32
<b>Tabela 7.</b> Média da concentração de amônia ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e desvio padrão (DP) após sete dias de tratamento com OTC.....	33
<b>Tabela 8.</b> Média da concentração de amônia ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e desvio padrão (DP) após dez dias de tratamento com FFC.....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sinais clínicos de infecção por <i>A. hydrophila</i> . A. Lesões bilaterais; B. Lesões epidérmicas com bordas vermelhadas; C. Dilatação do celoma e exoftalmia; D. Corrosão da nadadeira caudal.....	16
<b>Figura 2.</b> Chave de identificação de espécies de aeromonas Aerokey II <i>adaptada</i> de Carnarhan et al., (1991).....	18
<b>Figura 3.</b> A. Secagem da ração após adição de antibiótico. B. Pesagem 2,0% peso corporal para cada tratamento.....	19
<b>Figura 4.</b> A e B Aspecto geral da disposição dos Tratamentos.....	20
<b>Figura 5.</b> Relação (média) da concentração-mortalidade nos testes de toxicidade aguda com OTC para o pacu.....	22
<b>Figura 6.</b> A. Exposição dos organismos na maior concentração de OTC, 8,5 mg.L <sup>-1</sup> (100% de mortalidade). B. Exposição dos organismos na maior concentração de FFC, 1000 mg.L <sup>-1</sup> (não ocorreu mortalidade)..	22
<b>Figura 7.</b> Variação média de oxigênio dissolvido dos dois testes de toxicidade aguda com OTC para o pacu.....	25
<b>Figura 8.</b> Sobrevivência de pacu após tratamento com OTC.....	28
<b>Figura 9.</b> Indivíduos de pacus após dez dias de tratamento com FFC. Em A e B: Controle sem infecção, C e D: Controle com infecção, E e F: 5,0 mgFFC.Kg <sup>-1</sup> , G e H: 10,0 mgFFC.Kg <sup>-1</sup> , I e J: 15,0 mgFFC.Kg <sup>-1</sup> . Seta: lesões cutâneas causada pela bactéria.....	29
<b>Figura 10.</b> Sobrevivência de indivíduos após tratamento com FFC.....	30
<b>Figura 11.</b> Fotomicrografia de cortes transversais de pele de pacu coletado após tratamento com os antibióticos. A. Controle sem infecção, demonstrando as camadas da pele e o imbricamento dérmico das escamas; Asterisco: cromatóforos; B: Após tratamento de <i>A. hydrophila</i> com 140 mgOTC.Kg <sup>-1</sup> . C: células caliciforme; Seta: células mucosas; V: vasos. C: 170,0 mgOTC.Kg <sup>-1</sup> ; II: infiltrado inflamatório; D: 10,0 mgFFCKg <sup>-1</sup> , local da lesão em cicatrização. TC: tecido conectivo; TM: tecido muscular; ZD: zona de delimitação da lesão. Em A, B e C, barra 1cm = 34,5 µm e em D, 276 µm. Coloração HE.....	35
<b>Figura 12.</b> Fotomicrografia de pele de pacu após 10 dias de tratamento FFC. A: 5,0 mgFFC.Kg <sup>-1</sup> , células mucosas secretando mucosubstâncias; C: células caliciformes; Seta: células mucosas; Asterisco: cromatóforos e em B: 5,0 mgFFC.Kg <sup>-1</sup> , formação de camada de células basais na epiderme. Fase de reorganização do colágeno e preenchimento por tecido conectivo; CB: células basais; TC: tecido conectivo. Barras 1cm = 13,8 µm. A: Coloração PAS; B: Coloração HE.....	36

- Figura 13.** Fotomicrografia de cortes transversais de brânquias de pacu após sete dias de tratamento com OTC ou 10 dias com FFC. A. Controle sem infecção; LP: lamela primária; LS: lamela secundária; SVC: seio venoso central; CM: células mucosas, CR: células de revestimento; Seta: células pilares; Asterisco: células cloreto; B: Controle com infecção; C: Após tratamento de *A. hydrophila* com 140 mgOTC.Kg<sup>-1</sup>; E: edema subepitelial; D: Com 15 mgFFC.Kg<sup>-1</sup>; D: desestruturação da estrutura de sustentação; FL: fusão lamelar apical; Barras de 1 cm: 34,5 µm. Coloração HE..... 39
- Figura 14.** Fotomicrografia de cortes transversais de Brânquia de pacu após 10 dias de tratamento com FFC (10,0 mg.Kg<sup>-1</sup>). AN: aneurisma. Barra 1cm = 34,5 µm. Coloração HE..... 40
- Figura 15.** Fotomicrografia de cortes transversais de fígado após dez dias de tratamento de *A. hydrophila* com FFC. A: controle sem infecção, demonstrando o arranjo cordonal dos hepatócitos; Asterisco: hipertrofia; Seta: capilares sinusóides; B: controle negativo, glicogênio nos hepatócitos; GC: glicogênio; C: 5,0 mgKg<sup>-1</sup>, hipertrofia e em D: 15,0 mgKg<sup>-1</sup>, ausência de glicogênio. Em A e C, barras 1cm = 69,1 µm, em B, 13,8 µm e em D, 34,5 µm. A e C: Coloração HE e B e D: Coloração PAS..... 43
- Figura 16.** Fotomicrografia de cortes transversais de Rim de pacu. A e B: controle sem infecção. TD: túbulo distal; TP: túbulo proximal; G: glomérulo; H: tecido hematopoiético; CM: centro macrofágicos; A: Barras de 1cm = 69,1 µm e em B: 34,5 µm. Coloração HE..... 45

## **Ecotoxicidade e Eficácia da Oxitetraciclina e do Florfenicol contra Infecção Experimental por *Aeromonas hydrophila* e Aspectos Histopatológicos em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

### **Resumo**

Um dos problemas da aquicultura é a ocorrência frequente de infecções por parasitos e bactérias, principalmente em sistemas de criação intensiva. Entre os antibióticos, a oxitetraciclina (OTC) e o florfenicol (FFC) são os mais usados para tratar infecções causadas por bactérias em peixes. Os objetivos foram estimar a concentração letal 50% (CL50;48h) da OTC (Terramicina<sup>®</sup>) e do FFC (Aquaflor<sup>®</sup>) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), classificar a OTC e o FFC pelo risco de intoxicação ambiental; determinar a dose eficaz de OTC e de FFC administrada na ração para o controle da infecção por *Aeromonas hydrophila* em pacu; avaliar o efeito da diluição da OTC e do FFC nas variáveis de qualidade de água durante os testes de toxicidade e durante o tratamento e avaliar as alterações histopatológicas após o tratamento com OTC e FFC. Para os testes de toxicidade aguda os animais (peso entre 0,5 e 1,0 g) foram expostos a 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5 mgL<sup>-1</sup> de OTC ou a 600,0; 700,0; 800,0; 900,0 e 1000,0 mgL<sup>-1</sup> de FFC e um tratamento controle. A OTC e o FFC foram classificados pela toxicidade aguda e pelo risco ambiental de acordo com as classes de valores de CL50;48h. Para o tratamento de infecção induzida por *A. hydrophila* (3.0 x10<sup>8</sup> bactéria.mL<sup>-1</sup>), foram realizados dois testes, um com OTC (110,0; 140,0 e 170,0 mg.Kg<sup>-1</sup>) e outro com FFC (5,0; 10,0 e 15,0 mg.Kg<sup>-1</sup>). Os tratamentos foram três concentrações de cada antibiótico, um controle sem infecção e um com infecção. Para análise histopatológica foram coletados fragmentos de brânquia, fígado, rim e pele dos peixes após o tratamento com os antibióticos. As variáveis de qualidade de água registradas diariamente foram pH, temperatura, condutividade elétrica e concentração de oxigênio dissolvido, nos testes de toxicidade aguda e durante os testes de concentrações curativas. Nos testes de toxicidade aguda, a CL50;48h estimada de OTC para o pacu foi 7,6 mgL<sup>-1</sup> e de FFC > 1.000 mgL<sup>-1</sup>. A OTC reduziu a concentração do oxigênio dissolvido durante os testes de toxicidade aguda e é de baixo risco de intoxicação ambiental para o pacu. O FFC é sem risco de intoxicação ambiental para o pacu e não altera as variáveis de qualidade da água. O FFC é eficaz na concentração de 10,0 mg kg<sup>-1</sup> de ração para o controle de *A. hydrophila* em pacu e a OTC, em concentração de até 170,0 mg kg<sup>-1</sup> de ração, não é eficaz. A OTC e o FFC inclusos na ração não alteraram as variáveis de qualidade de água durante o tratamento. A *A. hydrophila* causou lesão na epiderme, derme e musculatura e

fusão lamelar, edema subepitelial, aneurisma, hipertrofia e hiperplasia de células mucosas, cloreto e de revestimento das brânquias. A *A. hydrophila* e a administração dos antibióticos causaram hipertrofia dos hepatócitos, porém não causou alteração no rim.

**Palavras-Chave:** antibióticos; doenças; ecotoxicidade; terapia.

**Ecotoxicity And Effectiveness of the Oxytetracycline and of Florfenicol against Experimental Infection of *Aeromonas hydrophila* and Histopathologicals Effects in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

**Abstract**

One of the main problems of modern aquaculture is the occurrence of infection of farmed fish by parasites and bacteria, especially in intensive systems. Among the antibiotics, the oxytetracycline (OTC) and the florfenicol (FFC) are the most commonly used to treat infections caused by bacteria in fishes. The objective was to estimate the 50% lethal concentration (LC<sub>50</sub>, 48h) of OTC (Terramycin<sup>®</sup>) and of the FFC (AQUAFLO<sup>®</sup>) for the pacu (*P. mesopotamicus*), classify the OTC and FFC according to the assessment risk and to determine the effective concentration of OTC and of FFC administered in feed for control of *Aeromonas hydrophila* in pacu; to evaluate the effect of dilution of OTC and of the FFC in variables in water quality during toxicity tests and for treatment and to evaluate the histopathological changes after treatment with OTC and FFC. For acute toxicity tests the animals (weighing between 0.5 and 1.0 g) were exposed to 7.0, 7.5, 8.0 and 8.5 mg.L<sup>-1</sup> OTC or 600.0, 700, 0, 800.0, 900.0 and 1000.0 mg.L<sup>-1</sup> of FFC and a control treatment. The OTC and the FFC were classified for acute toxicity and for environmental risk according to the ranking of value of LC<sub>50</sub>;48h. For the treatment of *A. hydrophila* induced by experimental infection (3.0 x10<sup>8</sup> bacteria.mL<sup>-1</sup>), were carried out two tests, one with OTC (110.0, 140.0 and 170.0 mg.Kg<sup>-1</sup>) and another with FFC (5.0; 10.0 and 15.0 mg.Kg<sup>-1</sup>). The treatments included three concentrations of antibiotic, a control without infection and a with infections. For histopathological analysis were collected gill tissue, liver, kidney and skin of fish after the treatment of bacterial diseases with antibiotics. The water quality variables were recorded daily pH, temperature, electrical conductivity and dissolved oxygen in acute toxicity tests and during treatment. In tests of acute toxicity, the LC<sub>50</sub>;48h estimated of OTC for pacu was 7.6 mg.L<sup>-1</sup> and of FFC > 1000 mg.L<sup>-1</sup>. The OTC reduced the concentration of dissolved oxygen during the tests for acute toxicity is of low assessment risk for pacu. The FFC is without assessment risk for pacu and he does not change the water quality variables. The FFC is effective in concentration of 10.0 mgkg<sup>-1</sup> feed to control *A. hydrophila* in pacu. The OTC in concentrations of up to 170.0 mg.kg<sup>-1</sup> of diet is not effective for control of *A. hydrophila* in pacu. A *A. hydrophila* caused damage to the epidermis, dermis and muscle and lamellar fusion, subepithelial

edema, aneurysm, hypertrophy and hyperplasy of mucous cells, chloride and coating the gills. A *A. hydrophila* and administration of antibiotics caused hypertrophy of hepatocytes, but not caused change in the kidney

**Keywords:** antibiotics; diseases; ecotoxicology, therapy

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas da aquicultura moderna é a ocorrência de infecções por parasitos e bactérias, principalmente em sistemas intensivos (Cruz, 2005). As parasitoses e bacterioses destacam-se como importantes fatores limitadores da produtividade, pois provocam atraso no crescimento e altas taxas de mortalidade (Ranzani-Paiva et al., 1997).

Os agentes com potencial patogênico (bactérias, fungos, protozoários ou metazoários) estão presentes no ambiente aquático, na pele e no sistema digestório dos peixes (Roberts e Bullock, 1980). Quando os organismos são submetidos a estresse, como em criações intensivas, ocorre imunossupressão, desencadeando as enfermidades causadas por agentes oportunistas (Marty, 1986).

Entre os fatores estressantes incluem alta densidade de estocagem, temperaturas elevadas, mudanças bruscas de temperatura, traumatismos decorrentes de manejo, baixa concentração de oxigênio dissolvido na água, condição nutricional deficiente, e infecções por fungos ou parasitos que contribuem para as mudanças fisiológicas e aumento da suscetibilidade à infecções (Aoki, 1999).

Ceccarelli et al., (1990) relatam a ocorrência de colunariose (*Flavobacterium columnaris*) em alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) nas pisciculturas do CEPTA entre 1983 e 1990. Békési (1992) cita a morte de peixes de várias espécies, inclusive de pacu na região Nordeste do país, causada por septicemia provocada por *Aeromonas* sp. e por *Flavobacterium* spp. Souza et al. (1996) descrevem a presença de *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Enterobacteriaceae* e *Vibrio* em pacu, curimatá e tambaqui no Estado de São Paulo.

As bactérias do gênero *Aeromonas* pertencem à família Aeromonadaceae e são encontradas em diversos habitats. As espécies que causam doenças em peixes incluem: *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. sobri*, *A. caviae*, *A. allosaccharophila* e *A. salmonicida*. Esta última é a única do complexo que não é móvel e é um patógeno obrigatório (Griffin et al., 1953; Austin e Austin, 1987).

A *A. hydrophila* é um bastonete móvel Gram-negativo que causa septicemia hemorrágica. Esta doença apresenta lesões superficiais, como petéquias, exoftalmia e internamente, pode haver acúmulo de líquido ascítico, anemia e necrose no fígado e rins (Austin e Austin, 1987).

A expansão da aqüicultura tem por conseqüência o aumento da utilização de produtos químicos para o controle de parasitos e bactérias. Entre os antibióticos, a oxitetraciclina (OTC) e o florfenicol (FFC) são os mais usados para tratar infecções causadas por bactérias oportunistas em peixes (Rigos et al., 2005). Estes dois antibióticos são utilizados na terapia e profilaxia de bacterioses em humanos, em medicina veterinária que inclui a prática da aqüicultura, para tratar infecções causadas por bactérias Gram-negativas (Pellinen et al., 2002; Rigos et al., 2006).

Os antibióticos podem ser administrados adicionados à ração ou em banhos de imersão. A utilização na alimentação é mais conveniente, pois a quantidade necessária de antibiótico nesse tipo de tratamento é menor que a utilizada diretamente na água e o resíduo gerado para o ambiente também é menor (Ferreira et al., 2007).

A OTC tem amplo espectro de ação contra as bactérias de peixes (Barragy, 1994). A OTC é eficaz no tratamento de colunariose e aeromonose (Bullock et al., 1986; Thomas-Jinu e Goodwin, 2004; Andrade et al., 2006).

O FFC é eficaz contra a infecção por *A. salmonicida subsp. salmonicida*, *A. hydrophyla*, *F. psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* e *Vibrio anguillarum* (Fukui et al., 1987; Nordmo et al., 2006).

Esse antibiótico é caracterizado por alta biodisponibilidade em peixes, boa penetração nos tecidos e rápida eliminação (Horsberg et al., 1996), todas as características importantes para uma substância ser utilizada no tratamento de animais, como peixes, produzidos para o consumo humano.

Poucos países dispõem de estatísticas abrangentes a respeito da quantidade de fármacos veterinários utilizados nas diversas criações animais (Díaz-Cruz e Barceló, 2007). No entanto, estima-se que mais de 70% dos fármacos utilizados na medicina veterinária sejam agentes antibióticos (Thiele-Bruhn, 2003).

Há necessidade de estudos sobre os possíveis efeitos que o uso de antibióticos podem causar nos tecidos dos organismos após o tratamento. Alguns autores observaram diminuição do tecido hematopoiético dos rins, imunossupressão e necrose do fígado após o uso de OTC (Bruno, 1989; Gaikowski et al., 2003; Schering-Plough, 2009).

Os produtos utilizados na produção animal podem chegar ao ambiente aquático de forma direta no tratamento de doenças dos organismos de criação, ou de forma indireta, por meio de lixiviação desses compostos oriundos da produção animal. Dessa forma é necessário conhecer os

possíveis efeitos que estes produtos podem causar nos organismos não alvo e nos ambientes aquáticos que os antibióticos são aplicados.

No Brasil, há poucas informações sobre as concentrações de antibióticos e como devem ser administrados na produção aquícola. Os antibióticos são usados de forma indiscriminada com lançamentos em grandes quantidades nas pisciculturas e nos corpos hídricos. As informações sobre o monitoramento da concentração e do impacto ambiental, especialmente, em relação à toxicidade aguda, risco de intoxicação das espécies de criação e possíveis efeitos adversos do tratamento são escassas. Assim, é necessário o desenvolvimento de protocolos de tratamento específicos para as espécies neotropicais, como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), muito utilizado em criações no Brasil.

Este trabalho apresentou ampla abordagem sobre os antibióticos oxitetraciclina e florfenicol no tratamento de infecção experimental por *A. hydrophila*, para estabelecer a concentração eficaz no combate a infecção e as consequências estruturais dessa infecção.

## 2 OBJETIVOS

Objetivaram-se com este trabalho:

- 1) Determinar a toxicidade aguda (CL(I)(50;48h) dos antibióticos OTC (Terramicina<sup>®</sup>) e FFC (Aquaflor<sup>®</sup>) para o pacu (*P. mesopotamicus*);
- 2) Classificar a OTC e o FFC pelo risco de intoxicação ambiental para o pacu;
- 3) Avaliar o efeito da diluição da OTC e do FFC nas variáveis de qualidade de água durante os testes de toxicidade aguda;
- 4) Determinar a concentração eficaz da OTC e do FFC, administrados na ração, no controle da bacteriose causada por *A. hydrophila* em pacu após inoculação experimental;
- 5) Avaliar o efeito da administração de ração com OTC e com FFC nas variáveis de qualidade de água durante o tratamento;
- 6) Avaliar as alterações histopatológicas em brânquia, fígado, rim e pele de pacu (*P. mesopotamicus*) após o tratamento da infecção experimental por *A. hydrophila* com OTC e FFC;

### 3 REVISÃO BILIOGRÁFICA

#### 3.1 *Aeromonas hydrophila*

Dentre os vários patógenos, as bactérias constituem o grupo de agentes etiológicos que causam as maiores perdas econômicas na aquicultura (Frerichs e Millar, 1993).

As bactérias do gênero *Aeromonas* estão presentes naturalmente no ecossistema aquático e fazem parte da flora microbiana natural dos organismos aquáticos (Fraire, 1978). Dentre elas as móveis mais virulentas pertencem à espécie *A. hydrophila* (Holliman, 1993).

A doença causada por *A. hydrophila* está associada ao excesso de matéria orgânica na água (Post, 1987), e temperaturas acima de 28°C. Essa bactéria é um patógeno oportunista, considerado invasor secundário, que causa infecção em peixes imunossuprimidos e/ou associa-se à infecção por outros patógenos, como no caso do protozoário ciliado *Epistylis* (Vieira, 2003).

A *A. hydrophila* é um bastonete móvel, com flagelo polar, com motilidade ativa e produz ácido e gás a partir de carboidratos, não produz esporos, é Gram negativa, não capsulada, oxidase positiva e anaeróbia facultativa (Stoskopf, 1993).

Essa bactéria causa septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais e hemorragias locais, como petéquias, nas brânquias e opérculos, exoftalmia e distensão abdominal. Internamente, pode haver líquido ascítico, anemia e necrose hepática e renal (Austin e Austin, 1987).

A *A. hydrophila* é caracterizada por produzir substâncias tóxicas que causam necrose e hemorragia (Kanai e Wakabayashi, 1984). Nord et al. (1975) demonstraram que linhagens de *A. hydrophila* produzem gelatinase, caseinase, elastase, lipase, lecitinase e deoxiribonuclease, juntamente com hemolisinas, citotoxinas e enterotoxinas.

As hemolisinas são proteínas citolíticas extracelulares que agem formando poros na membrana celular de eritrócitos por inserção na camada bilipídica, comprometendo a seletividade de filtração (Howard e Buckley, 1985). As enterotoxinas são produtos extracelulares que podem agir sobre o epitélio intestinal e produzem inflamação. As proteases podem contribuir para a patogenicidade e causar danos diretos nos tecidos ou aumentar a capacidade de invasão (Sakai 1985 a, b). As hemaglutininas são componentes da camada superficial bacteriana que permite a sua ligação aos grupos receptores dos eritrócitos (Cahill, 1990).

A presença de uma camada S na superfície bactérias Gram negativas foi relacionada com a patogenicidade destas bactérias. A camada S é uma estrutura composta por proteínas ou glicoproteínas ligadas à parede celular bacteriana cujas funções são servir como reservatório de água e nutrientes, aumentar a aderência a superfícies e formar biofilmes, aumentar a capacidade invasiva das bactérias que escapam mais facilmente à ação dos fagócitos e aumentar a resistência microbiana a antibióticos (Carvalhall e Alterthum, 1999).

Angka et al. (1995) isolaram várias cepas de *A. hydrophila* de *Ictalurus punctatus* de diversos ambientes do oeste de Java, na Indonésia, que apresentaram diferentes níveis de virulência. Várias cepas foram capazes de provocar lise de eritrócitos de peixes, coelhos, ovelhas, vacas, cavalos e do homem. Até cinco dias após a injeção intracelomática da bactéria, os peixes apresentaram lesões musculares, na pele do local da injeção, no fígado e rins.

A aeromonose manifesta-se como septicemia hemorrágica produzindo necrose dos tecidos e órgãos (Dean e Tost, 1967; Ketover et al., 1973; Quadri et al., 1976; Joseph et al., 1979). Os peixes ainda apresentam hemorragias cutâneas nas nadadeiras e na superfície do corpo (Hoshina, 1962).

Os sinais clínicos da aeromonose nos peixes incluem: perda de apetite, apatia, perda de equilíbrio, lesões epidérmicas como despigmentação, necroses e perda da pele com exposição da musculatura. Internamente, os órgãos podem estar friáveis e esbranquiçados, a cavidade celomática com exsudato, intestino flácido com muco amarelo e sem alimento (Plumb, 1994).

Os animais enfermos apresentam pele escura, ascite, extensas hemorragias na superfície do corpo e na base das nadadeiras. Através da necropsia, observa-se órgãos internos congestionados e hemorrágicos e o rim e o baço aumentados (Figueiredo e Plumb, 1977).

As alterações histopatológicas causadas por *A. hydrophila* incluem hemorragias capilares submucosa do estômago, degeneração das células hepáticas e do epitélio dos túbulos renais, que destroem os glomérulos e provocam acúmulo de exsudato serofibrinoso no tecido hematopoiético (Miyazaki e Jo, 1985; Miyazaki e Kaige, 1985). Segundo Figueiredo e Plumb (1977) ocorre contração e necrose do tecido hematopoiético; do pâncreas; do músculo cardíaco e do fígado, além da mucosa intestinal se desprender facilmente.

### 3.2 Controle de *A. hydrophila*

A expansão da aqüicultura tem contribuído para o aumento da utilização de produtos químicos para o controle de parasitos e bactérias. Entre os antibióticos, a OTC e o FFC são os mais usados para tratar infecções causadas por bactérias de peixes (Rigos et al., 2005). Estes dois antibióticos são utilizados no tratamento de bacterioses em humanos, em medicina veterinária e em aqüicultura, para infecções por bactérias Gram-negativas (Pellinen et al., 2002; Rigos et al., 2006).

Os antibióticos podem ser administrados aos peixes adicionados à ração ou por meio de banhos de imersão. A utilização na alimentação é mais conveniente, pois a quantidade necessária de antibiótico nesse tipo de tratamento é menor que a utilizada diretamente na água, assim como o resíduo gerado para o ambiente é menor (Ferreira et al., 2007).

#### 3.2.1 Oxitetraciclina

##### 3.2.1.1 Controle de Bacterioses

Os antibióticos mais administrados em misturas com rações animais são a sulfamerazina, OTC, cloranfenicol e nifurpirinol (Fijan et al., 1976), e os melhores resultados são com os antibióticos análogos aos fluorados e os derivados das tetraciclina, nitrofuranos e sulfonamidas (Austin e Austin, 1987).

A meia vida da OTC em *I. punctatus*, administrada na ração ( $60 \text{ mgOTCkg}^{-1}$ ) foi de 80,3 horas e o pico plasmático de quatro horas (USP, 2000). Segundo Micromedex (2000) a meia vida em truta é de 60,3 a 89,5 horas.

No Brasi o uso de OTC na aqüicultura é amplo, porém não regulamentado. Dessa forma, o uso é indiscriminado e tem ocasionado o aparecimento de bactérias resistentes nos sistemas de produção (Pereira Júnior et al., 2006).

A OTC é indicada para tratar úlcera, furunculose e septicemia hemorrágica causada por *A. salmonicida* e *A. liquefaciens* e pseudomonas em salmonídeos; septicemia e pseudomonas em *I. punctatus*; combinada com ormetropina e sulfadimetoxina para controle de furunculoses causadas por *A. salmonicida* em salmonídeos e septicemia causada por *E. ictaluri* em *I. punctatus* (Dixon e Issvoran, 1992; Griffin, 1992; Plumb, 1999).

A OTC é registrada pelo Ministério da Agricultura nos seguintes países: Japão (50 mgkg<sup>-1</sup>), Canadá e China (50 a 100 mgkg<sup>-1</sup>), Espanha (75 mg.kg<sup>-1</sup>) e Estados Unidos (1250 a 1750 mgkg<sup>-1</sup>) indicada por três a dez dias de tratamento (Scott, 1993; Namdari et al., 1996; FDA, 1998; Ueno, et al., 2003; Wang e Li, 2004).

Segundo Thomas-Jinu e Goodwin (2004), a OTC foi 100% efetiva para o tratamento de *Flavobacterium columnare* em *I. punctatus*. Bullock et al., (1986) também verificaram eficácia no controle de surtos de enfermidades com administração oral de 80 mgOTCkg<sup>-1</sup>. Alexandrino et al., (1998/1999) também obtiveram sucesso ao administrarem 80 mgOTCkg<sup>-1</sup> para tratar *E. tarda* em truta arco-íris (*O. mykiss*). Andrade et al., (2006) verificaram eficácia no tratamento com OTC mais NaCl, do bagre *Rhamdia quelen* infectado com *A. hydrophila* e com *Ichthyophthirius multifiliis*.

O uso da OTC tem demonstrado que a biodisponibilidade é baixa quando administrada na ração: 0,6% em *Cyprinus carpio* (Grondel et al., 1987); 1,25 – 5,6% em *O. mykiss* (Björklund e Bylund, 1991; Nouws et al., 1992) e 9,3% em *Plecoglossus altivelis* (Uno, 1996), sendo adicionada na ração.

### 3.2.1.2 Toxicidade e Risco Ambiental

A OTC é um antibiótico do grupo das tetraciclina e vem sendo utilizado por décadas no tratamento de bacterioses, principalmente por ser eficaz, de baixo custo e de amplo espectro de ação (Miranda and Zemelman, 2002; Rigos et al., 2002; Ueno et al., 2004; Delépée et al., 2004; Reed et al., 2004).

A OTC possui ampla atividade e capacidade de difusão em fluidos e tecidos corpóreos (Barragy, 1994). Por essas razões, esse antibiótico é um dos mais usados no tratamento de bacterioses, em humanos, medicina veterinária e aquicultura, para tratar infecções por bactérias Gram-negativas (Pellinen et al., 2002; Rigos et al., 2006).

Cerca de 70 a 80% dos antibióticos administrados via oral aos peixes, chegam ao ambiente em alimentos não consumidos e pela excreção. Dessa forma, ocorre o acúmulo e a persistência desses compostos, que é influenciado por fatores físico químicos da água (pH, temperatura, salinidade, potencial redox) ou ambientais (temperatura e luz). A presença de luz acelera a degradação da OTC (meia vida de 9,75 dias), cuja sua meia vida é maior, em condições escuras (16,25 dias) (Samuelson, 1989).

A toxicidade de agentes químicos no meio hídrico é avaliada por meio de ensaios ectotoxicológicos com organismos representantes dos níveis tróficos das cadeias biológicas locais. O conhecimento da toxicidade desses agentes a diferentes organismos aquáticos possibilita, o estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas para a proteção da vida aquática e avaliar o impacto momentâneo que causam à biota dos corpos hídricos (Zagatto e Bertoletti, 2008).

Vários estudos foram realizados para avaliar a toxicidade aguda da OTC para organismos não alvo. Os testes com peixes foram realizados com *Morone saxatilis*, CL50;48h de 125,0 mgL<sup>-1</sup> (Hughes, 1973); *Salvelinus namaycush*, CL50;24h > 200,0 mgL<sup>-1</sup> (Webb, 2001); *Danio rerio*, CL50;96h > 1000 mgL<sup>-1</sup> (Isidori et al., 2005) e *Ozzyras latipes*, CL50;48h de 110,1 mgL<sup>-1</sup> (Kim, 2007).

Alguns autores avaliaram a toxicidade da OTC para microcrustáceos, como *Artemia parthenogenetica* (CE50;96h = 806 mgL<sup>-1</sup>) (Ferreira et al., 2007); *Daphnia magna* (CE50;24h = 82,64 mgL<sup>-1</sup>; Isidori et al., 2005); *Ceriodaphnia dubia* (CE50;48h = 18,65 mgL<sup>-1</sup>; Isidori et al., 2005); bactérias, *Vibrio fischeri* (CL 50% = 64,5 mgL<sup>-1</sup>; Wollenberge et al., 2000) e para algas, como *Pseudokirchneriella subcapitata* (CI50;72h = 0,17 mgL<sup>-1</sup>; Nunes et al., 2005); *Mycrocistis aeruginosa* (CE50% = 0,207 mgL<sup>-1</sup>; Holten-Lützhøft et al., 1999); *Rhodomonas salina* (CE 50% = 1,6 mgL<sup>-1</sup>; Holten-Lützhøft et al., 1999); *Selenastrum capricornutum* (CE 50% = 4,5 mgL<sup>-1</sup>; Holten-Lützhøft et al., 1999) e *Chlorella vulgaris* (CE50;72h = 7,05 mgL<sup>-1</sup>; Eguchi et al., 2004).

A avaliação de risco ambiental é outra uma ferramenta utilizada para avaliar o impacto dos compostos tóxicos, pois correlaciona a toxicidade aguda, em determinadas condições de laboratório, com a concentração ambiental estimada da recomendação de uso no campo (CAE) (Zagatto e Bertoletti, 2008).

Além da avaliação da toxidade aos organismos não alvo, após o tratamento é necessário avaliar os efeitos tóxicos nos tecidos dos organismos expostos aos produtos químicos. Segundo Rijkers et al. (1980) e Bruno (1989) a OTC causa efeitos imunossupressivos e pode causar necrose no fígado.

### 3.2.1.3 Alterações Teciduais

A OTC causa diversos efeitos no sistema imune cuja intensidade depende da espécie, do tamanho do peixe, da temperatura da água e da via de administração do antibiótico (Van der

Heijden et al., 1991). Serezli et al., (2005) observaram que ocorreu diminuição da ativação fagocitária em *Sparus aurata* e Lunden et al., (1998) verificou uma supressão da produção de anticorpos e do número de células brancas circulantes (principalmente linfócitos) em truta (*O. mykiss*).

A OTC causa efeitos tóxicos nos tecidos hematopoiéticos e reduz os índices hematológicos de *Cyprinus carpio* após a administração de 1500 mgkg<sup>-1</sup> (Svobodová, 2006). Segundo Soler et al., (1996) a OTC causa necrose hepática ao danificar o epitélio tubular e o tecido hematopoiético renal em *Tinca tinca* após administração intramuscular por sete dias.

### 3.2.2 Florfenicol

#### 3.2.2.1 Controle de Bacterioses

O cloranfenicol é um agente antimicrobiano com amplo espectro e foi muito utilizado na aquicultura para o controle de doenças bacterianas. Porém, esse antibiótico foi proibido em muitos países pelo seu potencial tóxico para humanos. Conseqüentemente, o tianfenicol foi desenvolvido, mas tem potencial antibiótico menor que o do cloranfenicol e uso limitado (Yunis et al., 1988).

O florfenicol (FFC) (D-(threo)-1-(methylsulfonylphenyl)2-dichloroacetamide-3-fluoro-1-propanol) é um fluorato derivado do tianfenicol e tem amplo espectro de ação que é similar ao do cloranfenicol e a atividade antibiótica maior que a do tianfenicol (Graham et al., 1988). O FFC é efetivo no tratamento de pseudotuberculose em *Seriola dorsalis* (Yasunaga e Yasumoto, 1988), edwarsielose em *I. punctatus* (McGinnis et al., 2003), vibriose em *Carassius auratus* (Fukui et al., 1987); furunculose e colunariose em *S. salar* (Inglis et al., 1991; USOFR, 2007).

O Aquaflor<sup>®</sup> nome comercial da formulação que contém o FFC, atualmente é indicado para uso no Brasil, Japão, Coréia do Sul, Noruega, Chile, Canadá e Reino Unido para o tratamento de bacterioses de várias espécies de peixes e representa 30,8% do consumo mundial de antibióticos usados na aquicultura (FAO, 2005). No Brasil, é o único antibiótico registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso em aquicultura, indicado para tilápia (*O. niloticus*) e truta (Schering Plough, 2009).

O FFC é usado em muitos países por ser eficaz no controle de várias infecções em peixes, mesmo que tenham desenvolvido resistência a outros antibióticos (Nordmo et al., 2006; Rangdale

et al., 1997; Bruun et al., 2000; Thyssen e Ollevier, 2001; Vue et al., 2002; Samuelsen e Bergh, 2004). O FFC é menos persistente no ambiente aquático que a OTC (Hektoen et al., 1995).

O FFC é caracterizado por ter alta biodisponibilidade em peixes, boa penetração nos tecidos e rápida eliminação (Horsberg et al., 1996), todas as características importantes para uma substância a ser utilizada no tratamento de animais, como peixes para alimentação humana.

O mecanismo de ação tóxica do FFC é a interferência na síntese de proteínas das bactérias e inibição da atividade da enzima peptidil transferase (Schering-Plough, 2009).

Vários estudos demonstram que o FFC possui excelentes propriedades farmacocinéticas (Martinsen et al., 1993; Horsberg et al., 1996) e demonstraram que o FFC adicionado na ração de *Salmo salar* é rapidamente absorvido e metabolizado para FFC amina e outros metabólitos. Traços de FFC amina foram encontrados em rins após 56 dias da administração de 20 mg.kg<sup>-1</sup>.

A duração da ação do FFC no plasma é de 30 a 40 horas após a administração da concentração indicada; biodisponibilidade é de 96,5%; meia vida é de 12,2 horas; o pico plasmático, 10,3 horas; taxa de eliminação é de 1,4 mL/min/kg; o limite máximo de resíduo (MRL) do FFC amina é de 1,0 mgkg<sup>-1</sup> e o tempo de eliminação no músculo de bagre e de salmão é de 12 dias (Martinsen et al., 1993; Schering-Plough, 2009).

O FFC é eficaz via oral no tratamento de enfermidades causadas por *A. salmonicida subsp. salmonicida*, *Edwardsiella ictaluri*; *A. hydrophyla* e *Vibrio anguillarum*, (Fukui et al., 1987; Inglis et al., 1991; Nordmo et al., 2006; Gaikowski et al., 2003; Seljestokken et al., 2006).

A concentração de FFC eficaz indicada pela maioria dos autores é 10 mgkg<sup>-1</sup>, incluindo para o controle de bacteriose em *Salmon salar*, *I. punctatus*, *Gadus morhua* e *O. niloticus* (Inglis et al., 1991; Nordmo et al., 2006; Gaikowski et al., 2003; Seljestokken et al., 2006; Schering-Plough, 2009) por um período de 10 a 20 dias, e alguns autores indicam de 10 a 15,0 mgkg<sup>-1</sup> para *sunshine bass* por 10 a 15 dias (Darwish, 2007).

### 3.2.2.2 Toxicidade e Risco Ambiental

Após o tratamento, os antibióticos podem persistir no ambiente aquático, principalmente adsorvido ao sedimento. Entretanto, a persistência do FFC é baixa e a concentração decresce rapidamente quando adsorvido nos sedimentos dos viveiros, cuja meia vida de 4,5 dias (Schering Plough, 2009).

Os antibióticos podem causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos não alvo (Ferreira et al., 2007). Porém, apesar do amplo uso, estudos científicos sobre a toxicidade e o risco ambiental do FFC ainda são escassos.

Alguns estudos ecotoxicológicos foram realizados com os peixes *O. mykiss*, CL(50;48h) > 780 mgL<sup>-1</sup> e *L. macrochirus*, CL50;48h > 830 mgL<sup>-1</sup> e com os microcrustáceos *D. magna*, CL50; 48h > 330 mgL<sup>-1</sup> (Schering Plough, 2009) e *A. parthenogenetica*, CL(50;48h) > 889 mgL<sup>-1</sup> (Ferreira et al., 2007). Alguns trabalhos envolvem algumas espécies de algas (*Tetraselmis chuii*; *Nostoc*, *Selenastrum capricornutum*) e de bactéria (*Bacillus subtilis*) (Ferreira et al., 2007; Schering Plough, 2009).

A avaliação de risco ambiental é uma análise da probabilidade da ocorrência de efeitos ecológicos adversos resultantes da exposição da biota a um ou mais estressores ambientais. Um estressor ambiental é usualmente um contaminante químico tóxico. Os efeitos ecológicos adversos são definidos como todas as mudanças consideradas indesejáveis que alteram a estrutura ou as características funcionais da população, da comunidade, do ecossistema ou de seus componentes (USEPA, 1998). O risco é calculado com a concentração ambiental estimada (CAE), ou seja, a concentração que é utilizada no campo e que vai entrar em contato com o meio ambiente, e a CL50 encontrada em testes ecotoxicológicos de toxicidade aguda em laboratório (USEPA, 1987). Com esses dados tem-se um quociente (Q) que caracteriza o risco de intoxicação ambiental do xenobiótico para determinada espécie na qual foi determinada a CL50.

Segundo Schering-Plough (2009) o FFC é um produto seguro para ser utilizado no ambiente aquático, pois não apresenta risco de intoxicação ambiental para peixes (*O. mykiss* e *L. macrochirus*), microcrustáceo (*D. magna*) e algas (*S. capricornutum* e *B. subtilis*).

### 3.2.2.3 Alterações teciduais

Os estudos científicos sobre possíveis alterações morfológicas nos tecidos após administração FFC, ainda são escassos. Gaikowski et al. (2003) e Schering-Plough (2009) relatam diminuição do tecido hematopoiético/linfopoiético de rins de *I. punctatus* e de *S. salar* após a administração de 10 mgFFCkg<sup>-1</sup> por 20 dias. Porém, outros autores, não relatam alteração após administração de 10 mgFFCkg<sup>-1</sup> por 10 dias (Inglis et al., 1991).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aclimação, testes preliminares de toxicidade aguda e de sensibilidade

Para os testes de toxicidade aguda, exemplares alevinos de pacu (*P. mesopotamicus*) foram previamente aclimatados por dez dias em caixa com capacidade para 250 litros, a  $25 \pm 2$  °C, com aeração contínua, fotoperíodo de 12 horas e alimentação à vontade com ração comercial (ABNT, 2004). Nos testes de toxicidade dos antibióticos foram utilizados organismos com peso entre 0,5 e 1,0 grama.

Primeiramente foi realizado teste de toxicidade aguda com a substância referência cloreto de Potássio (KCl) (ABNT, 2004) para avaliar a sanidade e a sensibilidade do lote de organismos teste. A concentração letal 50% estimada de KCl para o pacu foi de  $1,33 \text{ gL}^{-1}$ , com limite inferior de 1,17 e superior de  $1,52 \text{ gL}^{-1}$ .

Após a realização dos testes de sensibilidade foram realizados testes preliminares com os antibióticos OTC e FFC para determinar o intervalo de concentração que as substâncias causam zero e 100% de mortalidade.

Os testes foram realizados com a utilização de cinco concentrações dos antibióticos e um tratamento controle, com três repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Em todos os testes foram utilizados três peixes em cada repetição, na densidade máxima de  $1 \text{ gL}^{-1}$  de água, com volume total de três litros. Os testes foram conduzidos por 48 horas em sistema estático, sem substituição, sifonagem de água e alimentação dos animais. A avaliação da mortalidade foi diária, com a retirada dos peixes mortos dos recipientes (ABNT, 2004).

As condições ambientais iniciais foram: pH entre 7,0 e 8,0; oxigênio dissolvido entre 7,0 e  $8,0 \text{ mgL}^{-1}$ ; condutividade elétrica entre 170,0 e  $180,0 \mu\text{Scm}^{-1}$ ; dureza entre 50,0 a  $60,0 \text{ mgCO}_3^{-1}$ ; alcalinidade entre 200,0 e  $210,0 \text{ mgCaCO}_3^{-1}$ ; temperatura da sala de bioensaio entre 27 e 29 °C; e a temperatura das unidades experimentais entre 25 e 26 °C. As variáveis temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica da água foram registradas em 0, 24 e 48 horas após a exposição dos peixes aos antibióticos.

Os antibióticos utilizados foram a Terramicina<sup>®</sup> ( $5,5\text{gOTC}100\text{g}^{-1}$ ), produzido pela Pfizer<sup>®</sup> e o Aquaflo<sup>®</sup> ( $500\text{gFFCkg}^{-1}$ ) de FFC, produzido pela Intervet-Schering-Plough<sup>®</sup>.

## 4.2 Testes definitivos de toxicidade aguda dos antibióticos

A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares foram realizados dois testes definitivos para cada antibiótico. As concentrações de OTC utilizadas foram 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5 mgL<sup>-1</sup> e de FFC 600, 700, 800, 900 e 1000 mgL<sup>-1</sup>, e um controle (testemunha), com três repetições de cada concentração.

Ao final de 48 horas de exposição, com os dados de mortalidade, foi calculada a CL(I)50;48h para cada antibiótico com o programa Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al., 1977).

## 4.3 Risco Ambiental

Os antibióticos foram classificados pelo risco ambiental de cada concentração usada no experimento de tratamento de bacteriose em pacu de acordo com o quociente de risco ambiental calculados pela divisão simples entre a concentração ambiental estimada (CAE) e o valor da CL(I)50;48h (USEPA, 1987), encontrada no teste de toxicidade aguda em condições de laboratório (Tabela 2).

**Tabela 1.** Classes de risco ambiental de compostos tóxicos de acordo com os valores calculados do quociente Q (USEPA, 1987).

Q (CAE/CL50)	Classes
<0,1	Sem risco
0,1 -1,0	Risco baixo
1,0 - 10,0	Risco moderado
>10,0	Risco alto

A avaliação de risco ambiental dos antibióticos foi realizada com as concentrações testadas no presente trabalho para o controle de infecção causada por *A. hydrophila*: 110,0; 140,0 e 170,0 mgOTCkg<sup>-1</sup> e 5,0; 10,0 e 15,0 mgFFCkg<sup>-1</sup>. Assim, como as caixas utilizadas apresentavam capacidade de 60L, as CAE da OTC foram de: 1,83 mgL<sup>-1</sup>; 2,33 mgL<sup>-1</sup> e 2,83 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente e do FFC foram 0,083 mgL<sup>-1</sup>; 0,16 mgL<sup>-1</sup> e 0,25 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### **4.4 Técnica de indução de infecção experimental por *Aeromonas hydrophila* em pacu**

Para a indução de infecção foram utilizadas cepas de *A. hydrophila* cedida pelo Laboratório de Ictiopatologia do Departamento de Patologia Veterinárias da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp de Jaboticabal.

Os exemplares de pacus (*P. mesopotamicus*) apresetaram peso entre 30 e 35 gramas. Os animais foram mantidos em caixa de 400 litros e duas vezes ao dia, durante quatro dias, foram submetidos á captura. Após a captura os animais foram retirados da água por dois minutos para causar o estresse e diminuir a imunidade. Segundo Garcia (2005) o estresse causado por captura e falta de oxigênio serve de base para facilitar a infecção experimental pela bactéria *A. hydrophila*.

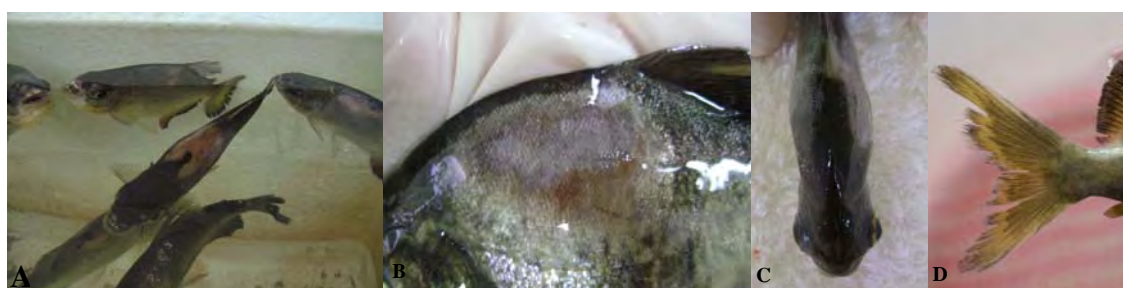
Após este período de indução de estresse os peixes foram submetidos à infecção de *A. hydrophila* por injeção intracelomática, intramuscular e subcutânea com aproximadamente  $2,4 \times 10^7$  bactéria mL<sup>-1</sup> (escala McFarland) e distribuídos em caixas de amianto com capacidade de 60L.

Em 24 horas após a infecção foram observados os primeiros sinais clínicos (Tabela 2 e Figura 1). Os sinais clínicos estão de acordo com os observados em outras espécies de peixes causados por *A. hydrophila* (Figueiredo e Plumb, 1977; Wakabayashi et al., 1981; Miyazaki e Kaige, 1985; Plumb, 1994).

**Tabela 2.** Sinais clínicos observados nos exemplares de pacu após 24 horas de infecção experimental com *A. hydrophila*.

Sinais Clínicos	Réplicas	Controle		FFC (mgkg <sup>-1</sup> )			OTC (mgkg <sup>-1</sup> )		
		CSI	CCI	5,0	10,0	15,0	110,0	140,0	170,0
Distensão do celoma (acúmulo de líquido ascítico)	A	0	x	x	x	x	x	x	x
	B	0	x	x	x	x	x	x	x
	C	0	x	x	x	x	x	x	x
Lesões bilaterais esbranquiçadas ou avermelhadas com erosão da pele	A	0	x	x	x	x	x	x	x
	B	0	x	x	x	x	x	x	x
	C	0	x	x	x	x	x	x	x
Corrosão da nadadeira caudal	A	0	x	x	x	x	x	x	x
	B	0	x	x	x	x	x	x	x
	C	0	x	x	x	x	x	x	x
Avermelhamento da periferia das lesões epidérmicas	A	0	x	x	x	x	x	x	x
	B	0	x	x	x	x	x	x	x
	C	0	x	x	x	x	x	x	x
Exoftalmia	A	0	x	x	x	x	x	x	x
	B	0	x	x	x	x	x	x	x
	C	0	x	x	x	x	x	x	x
Fígado Friável e Ictérico	A	0	x	x	x	x	x	x	x
	B	0	x	x	x	x	x	x	x
	C	0	x	x	x	x	x	x	x

CSI = controle sem infecção; CCI = controle com infecção; 0 = não ocorreu; x= ocorreu



**Figura 1.** Sinais clínicos de infecção por *A. hydrophila*. A. Lesões bilaterais; B. Lesões epidérmicas com bordas avermelhadas; C. Dilatação do celoma e exoftalmia; D. Corrosão da nadadeira caudal.

Após o surgimento dos sinais clínicos, alguns animais foram coletados para a comprovação de infecção por *Aeromonas*.

#### 4.5 Variáveis de qualidade de água

As condições iniciais de qualidade de água, antes de começar o tratamento dos pacus com os antibióticos foram: temperatura  $25 \pm 2$  °C; pH entre 6,5 e 7,5; O<sub>2</sub>D entre 7,0 e 8,0 mgL<sup>-1</sup> e condutividade elétrica entre 180,0 e 185,0 mScm<sup>-1</sup>.

Essas variáveis foram mensuradas durante o período de tratamento dos pacus com os antibióticos e amostradas no início, no meio e no final do experimento.

#### 4.6 Reisolamento de *Aeromonas hydrophila*

Após 24 horas da infecção experimental alguns peixes foram coletados, por meio de “swab”, para realizar a comprovação bioquímica de infecção por *Aeromonas hydrophila*. Foram coletadas várias amostras de fígado, rim e pele dos peixes e da água, que foram incubadas em meio líquido TSA.

As amostras foram incubadas em 100 mL de caldo soja triptona (TSB), acrescidas de ampicilina na concentração de 10 mgL<sup>-1</sup> (TSA) e incubadas por 24 horas a 30°C.

Das culturas obtidas no plaqueamento seletivo em caldo com ampicilina (TSB) foram selecionadas as colônias sugestivas de *Aeromonas* sp. e repicadas em ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina e em ágar dextrina-ampicilina. As colônias amareladas, com halo transparente devido à hidrólise do amido (ágar vermelho de fenol) e as colônias amareladas, circundadas por halo decorrente da hidrólise da dextrina (ágar dextrina) foram selecionadas para as etapas seguintes.

Após o período de incubação, foram realizados esfregaços corados pela técnica de Gram e as culturas que apresentavam bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas, foram repicadas em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) (Saad et al., 1995). Após incubação a 28 °C por 24 horas, as culturas que apresentavam reação ácida, tanto na base como no bisel, com coloração amarelada pela hidrólise do amido e com ou sem formação de gás foram novamente repicadas em ágar tripticase-soja.

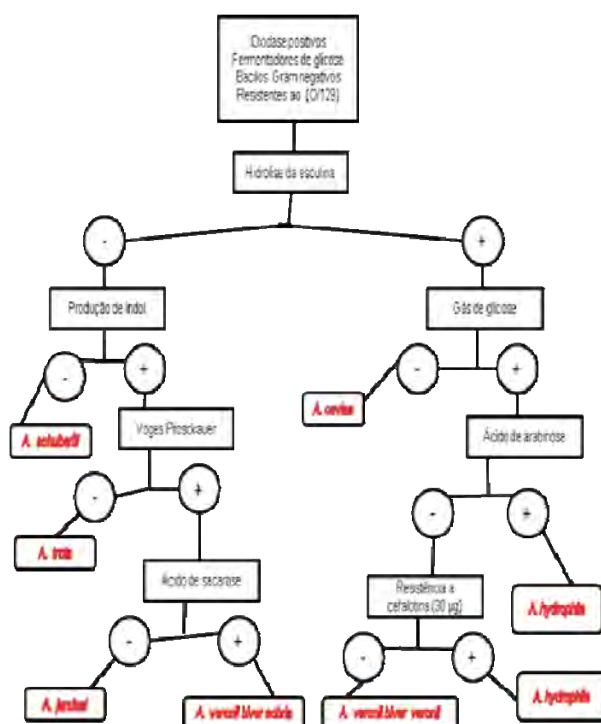
Em seguida, foram submetidas às provas da motilidade e oxidase seguindo esquema de caracterização adotado por Popoff (1984), Havelaar et al. (1987), Araujo et al. (1989), Knochel (1990), Neves et al. (1990) e Hudson e Lacy (1991).

Para a prova de motilidade as culturas de bactérias foram inoculadas em tubos contendo ágar semi-sólido e incubados a 28 °C por 24 horas e, as que apresentaram crescimento em toda a extensão do tubo foram consideradas positivas (Mac Faddin, 1976).

Para a realização da prova da oxidase foram realizados esfregaços das culturas de bactérias, com a utilização de alça de platina, em fitas adquiridas prontas para uso. Foram consideradas positivas as culturas cujos esfregaços tornaram-se de coloração rósea em alguns segundos.

Os cultivos que apresentavam as características de motilidade e oxidase positiva, foram considerados como de *Aeromonas* sp.

Para a identificação fenotípica da espécie *A. hydrophila* foi utilizada a chave de classificação Aerokey II (Carnarhan et al., 1991) (Figura 2). Esse sistema é válido na identificação das sete espécies mais comuns de aeromonas móveis (*A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *veronii*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. trota*, *A. schubertii* e *A. jandaei*) (Penders et al., 2008).



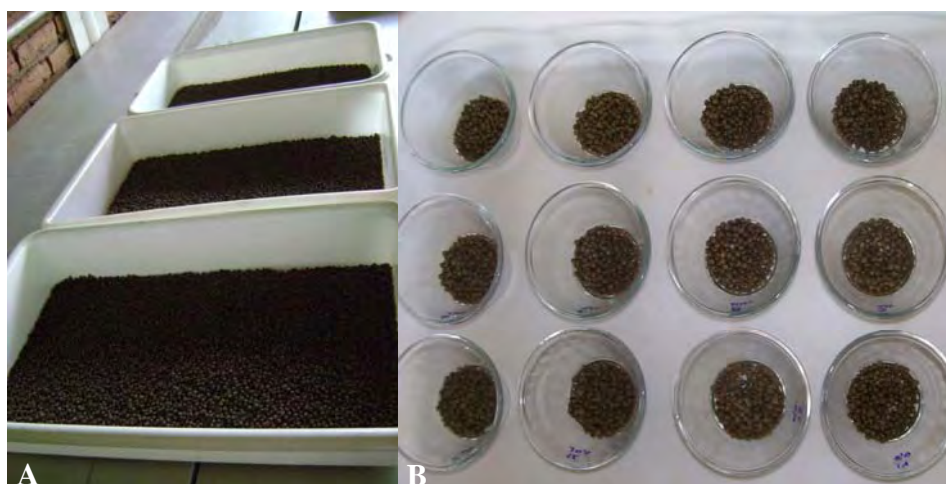
**Figura 2.** Chave de indentificação de espécies de aeromonas Aerokey II Adaptada de Carnarhan et al., (1991).

As provas bioquímicas realizadas foram: hidrólise da esculina, produção de gás a partir da glicose, Voges Proskauer (VP) e produção de ácido a partir da arabinose, sendo consideradas provas positivas: coloração alaranjada (esculina), produção de gás, coloração rósea (VP) e amarela (arabinose) para bactéria *A. hydrophila*.

#### 4.7 Tratamento de pacus infectados com *A. hydrophila* com OTC

No experimento com OTC foram utilizados 104 peixes, com massa corpórea entre 30 e 35 g.

Para o tratamento foi utilizada a ração da PoliNutri<sup>®</sup> com 32% de proteína bruta. Em cada quilo de ração foram acrescentados, de forma homogênea, 110,0; 140,0 e 170,0 mg de OTC dissolvida em 2% de óleo vegetal. Em seguida a ração foi mantida em temperatura ambiente por quatro dias para secagem (Figura 3A e B).



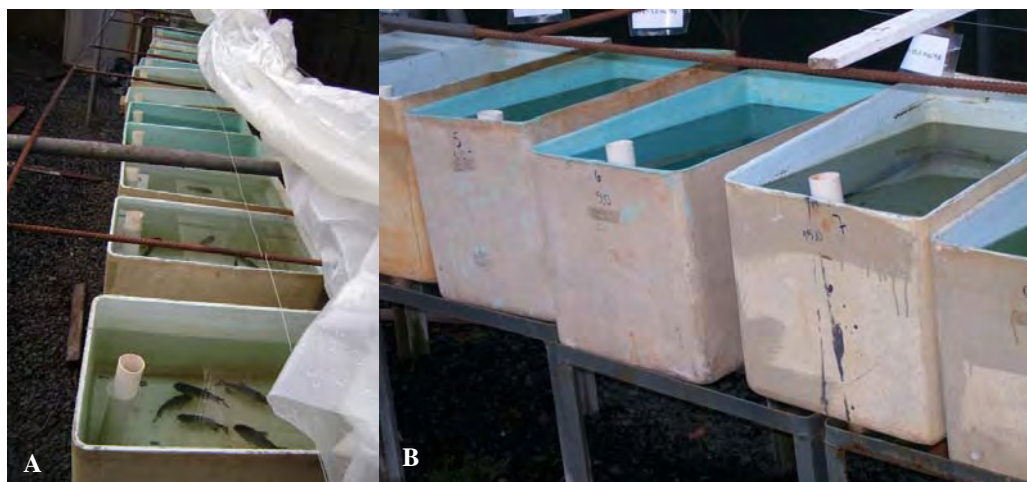
**Figura 3.** A. Secagem da ração após adição de antibiótico. B. Pesagem 2,0% peso corporal para cada tratamento.

As parcelas experimentais utilizadas foram caixas de cimento amianto, pintadas internamente com tinta epóxi azul, com capacidade de 70 L (Figura 4A e B).

Os tratamentos utilizados foram: controle sem infecção (não infectado e alimentado com ração comercial) controle com infecção (infectado e alimentado com ração comercial); 110; 140 e 170 mgOTCkg<sup>-1</sup> de ração.

Após 24 horas da infecção por *A. hydrophila* e os sinais clínicos presentes, os peixes foram submetidos ao tratamento com a OTC adicionado na ração, administrada por sete dias em dois períodos diários de arraçoamento (manhã e tarde) na quantidade de 2,0% peso corporal.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições para cada tratamento. O fluxo de água foi mantido constante em  $9,0 \text{ mLs}^{-1}$ .



**Figura 4. A e B.** Aspecto geral da disposição dos recipientes em que foram utilizados para os tratamentos experimentais.

As variáveis de qualidade de água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica) foram monitoradas no 1º, 3º, 5º e 7º dia, com a sonda YSI 556 MPS e a amônia no 1º, 3º e 7º dia de tratamento. A concentração de quantidade de amônia dissolvida na água foi determinada pelo método de Goltherman et al. (1978).

Diariamente foi avaliada a mortalidade, e os peixes mortos retirados dos recipientes experimentais. Ao final de sete dias de tratamento foi avaliada visualmente a presença de sinais clínicos externos da infecção nos peixes e calculada a porcentagem de sobrevivência dos organismos em cada tratamento.

#### **4.8 Tratamento de pacus infectados com *A. hydrophila* com FFC**

No experimento com FFC foram utilizados 64 pacus com peso variando entre 30 a 35 gramas.

Para o tratamento foi utilizada a ração da PoliNutri® com 32% de proteína bruta. Para cada quilo de ração foram acrescidos 5,0; 10,0 e 15,0 mg de FFC dissolvidos em 2% de óleo

vegetal. A ração foi mantida em temperatura ambiente por quatro dias para secagem. A concentração de  $10,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$  está de acordo com a indicada pela fabricante Intervet Schering-Plough e foram testadas também uma concentração menor e outra maior que a indicada pela empresa.

Os tratamentos utilizados foram: controle com infecção; controle sem infecção; 5,0; 10,0 e 15,0  $\text{mgFFCkg}^{-1}$  de ração. Após 24 horas da infecção por *A. hydrophila* e com a presença dos sinais clínicos, os peixes foram submetidos ao tratamento com a FFC incluso na ração, administrada por 10 dias, com dois períodos diários de arraçoamento (manhã e tarde), na quantidade de 2,0% biomassa de cada unidade experimental.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições cada tratamento. O fluxo da água nos recipientes foi mantido constante em  $9 \text{ mLs}^{-1}$ .

As variáveis de qualidade de água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica) foram registradas no 1º, 2º, 4º, 6º, 8º e 10º dia e amônia no 1º, 5º e 10º dia de tratamento.

Diariamente foi avaliada a mortalidade e os peixes mortos foram retirados das caixas. Ao final de dez dias de tratamento foi avaliada visualmente presença dos sinais clínicos externos nos peixes e calculada a porcentagem de sobrevivência dos organismos em cada tratamento.

#### **4.9 Histopatologia de brânquia, fígado, rim e pele de pacu**

Para a realização da avaliação histopatológica dos efeitos do tratamento com OTC e FFC, três animais de cada tratamento foram eutanasiados em banho de imersão com benzocaína ( $1\text{g}15\text{L}^{-1}$  de água).

Os fragmentos de tecidos de brânquia, fígado, rim e pele foram coletados e imersos em solução fixadora de formoldeído (10%) por 24 horas.

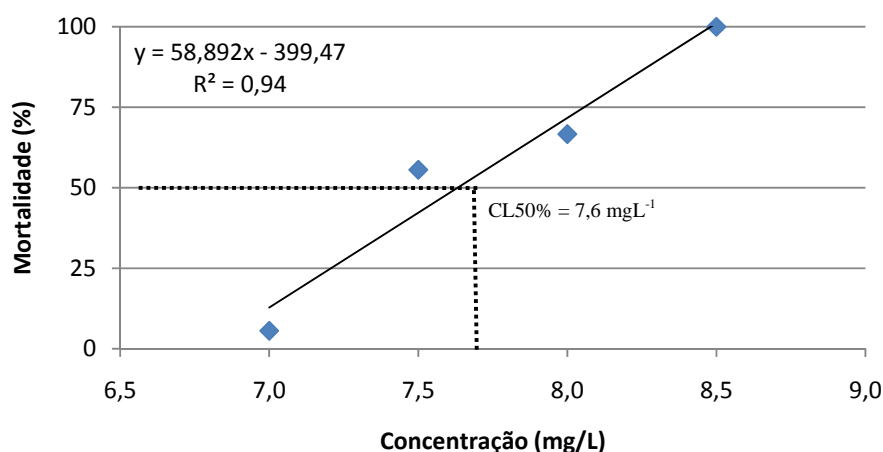
Após a fixação, os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e inclusão em Histosec® (Merck). A seguir, foi realizada a microtomia em micrótomo automático (Leica, RM-2155) obtendo-se cortes  $5 \mu\text{m}$  de espessura e coloração com hematoxilina-eosina (H.E) e reação em ácido periódico de Schiff (P.A.S) (Behmer et al., 1976).

A rotina foi realizada no Setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Anatomia da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

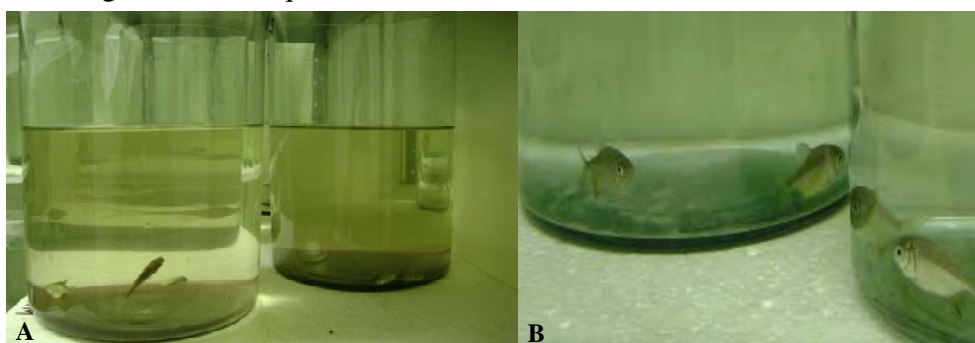
### 5.1 Toxicidade aguda e risco ambiental da OTC e do FFC

Nos testes de toxicidade aguda (CL 50;48h) com OTC não ocorreu mortalidade no controle; em  $7,0 \text{ mgL}^{-1}$  a mortalidade média foi de 5,55%; em  $7,5 \text{ mgL}^{-1}$ , de 55,56%; em  $8,0 \text{ mgL}^{-1}$ , de 66,67% e em  $8,5 \text{ mgL}^{-1}$ , foi 100%. Na figura 5 observa-se a equação da reta ajustada com os dados de mortalidade e o  $r^2$ .



**Figura 5.** Relação (média) da concentração-mortalidade nos testes de toxicidade aguda com OTC para o pacu.

A CL(I)50;48h média estimada da OTC para o pacu é de  $7,6 \pm 0,11 \text{ mgL}^{-1}$  com limite inferior  $7,34 \pm 0,15 \text{ mgL}^{-1}$  e superior de  $7,84 \pm 0,09 \text{ mgL}^{-1}$ . Na Figura 6A observa-se os peixes expostos a  $8,5 \text{ mgOTC.L}^{-1}$  em que ocorreu 100% mortalidade.



**Figura 6.** **A.** Exposição dos organismos na maior concentração de OTC:  $8,5 \text{ mgL}^{-1}$  (100% de mortalidade). **B.** Exposição dos organismos na maior concentração de FFC,  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  (não ocorreu mortalidade).

A toxicidade aguda da OTC para o pacu é maior do que para as seguintes espécies aquáticas: *Salvelinus namaycush* (CL50;24h > 200 mgL<sup>-1</sup>; Webb, 2001), *Morone saxatilis* (CL50;48h = 125,0 mgL<sup>-1</sup>; Boxall et al., 2002), *Danio rerio* (CL50;96h > 1000 mgL<sup>-1</sup>; Isidori et al., 2005); *Ozzyras latipes* (CL50;48h = 110,1 mgL<sup>-1</sup>; Kim, 2007); *Artemia parthenogenetica* (CL50;48h = 806,0 mgL<sup>-1</sup> e para *Tetraselmis chuii* (CI50;96h = 11,18 mgL<sup>-1</sup>; Ferreira et al., 2007).

A OTC foi menos tóxica para o pacu do que em relação à cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (CE50 = 0,207 mgL<sup>-1</sup>); as algas *Rodhomonas salina* (CE50 = 1,6 mgL<sup>-1</sup>) e *Selenastrum capricornutum* (CE50 = 4,5 mgL<sup>-1</sup>) (Halling-Sørensen et al., 2000).

A OTC é mais tóxica para algas do que para microcrustáceo e para peixes e é praticamente não tóxica para as outras espécies de peixe, cuja CL50 é acima de 100 mgL<sup>-1</sup>.

O FFC não causou mortalidade nas concentrações testadas (Figura 6B), portanto a CL(I)50;48h estimada é maior que 1000 mgL<sup>-1</sup>. A OECD (2009) determina que os testes de toxicidade aguda devem ser realizados com concentrações de até 100 mgL<sup>-1</sup>, pois a ausência de mortalidade nesta concentração indica que esse organismo não é o grupo mais sensível para a substância em exposição à curto prazo.

Nesse trabalho foram utilizadas concentrações de até 1000 mgL<sup>-1</sup>, ou seja, dez vezes a recomendada e constata-se que, com pelo menos 99% de confiança, o valor da CL50;48h do FFC é superior à concentração limite de 100 mgL<sup>-1</sup> (OECD, 2009).

Da mesma forma que para o pacu, o FFC também é de baixa toxicidade para *Onchorynchus mykiss* (CL50;48h > 780 mgL<sup>-1</sup>); *Lepomis macrochirus* (CL50;48h > 830 mgL<sup>-1</sup>); *Daphnia magna* (CL50;48h > 330 mgL<sup>-1</sup>) (Schering-Plough, 2009) e a *A. parthenogenetica* (CL50;48h > 889 mgL<sup>-1</sup>) (Ferreira et al., 2007). Para as espécies de algas *Tetraselmis chuii* (CI50;96h = 6,06 mgL<sup>-1</sup>) (Ferreira et al., 2007); *Nostoc* sp. (CI50;48h = 4,0 mgL<sup>-1</sup>), *Selenastrum capricornutum* (CI50;48h = 1,5 mgL<sup>-1</sup>) e *Bacillus subtilis* (CI50;48h = 0,4 mgL<sup>-1</sup>) (Schering-Plough, 2009) a toxicidade aguda do FFC é maior que para o pacu.

O FFC também demonstrou ser mais tóxico para as algas do que para microcrustáceo e para peixe, em que a CL50 é acima de 100 mgL<sup>-1</sup>.

Segundo Mallat, (1985) a toxicidade de um xenobiótico varia com a espécie, a idade dos indivíduos, o peso e o nível trófico a que está sendo exposto. Assim, as diferenças encontradas neste estudo e na literatura podem estar relacionadas com estas variáveis.

Em relação ao risco de intoxicação ambiental para o pacu (*P. mesopotamicus*), a OTC classifica-se como de baixo risco de intoxicação ambiental nas três concentrações testadas, e o FFC como sem risco de intoxicação ambiental. Portanto, o FFC é de uso seguro para o pacu devido à baixa toxicidade aguda para a espécie ( $CL_{50};48h > 100 \text{ mgL}^{-1}$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Classificação da OTC e do FFC pelo risco de intoxicação ambiental para o pacu.

Antibiótico	Concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	CAE ( $\text{mgL}^{-1}$ )	$CL_{50};48h$ ( $\text{mgL}^{-1}$ )	Q = (CAE/ $CL_{50};48h$ )	Risco (USEPA, 1987)
OTC	110,0	1,83	7,6	0,2	Baixo risco
	140,0	2,33		0,3	Baixo risco
	170,0	2,83		0,4	Baixo risco
FFC	5,0	0,083	> 1.000,0	0,000083	Sem risco
	10,0	0,16		0,00016	Sem risco
	15,0	0,25		0,00025	Sem risco

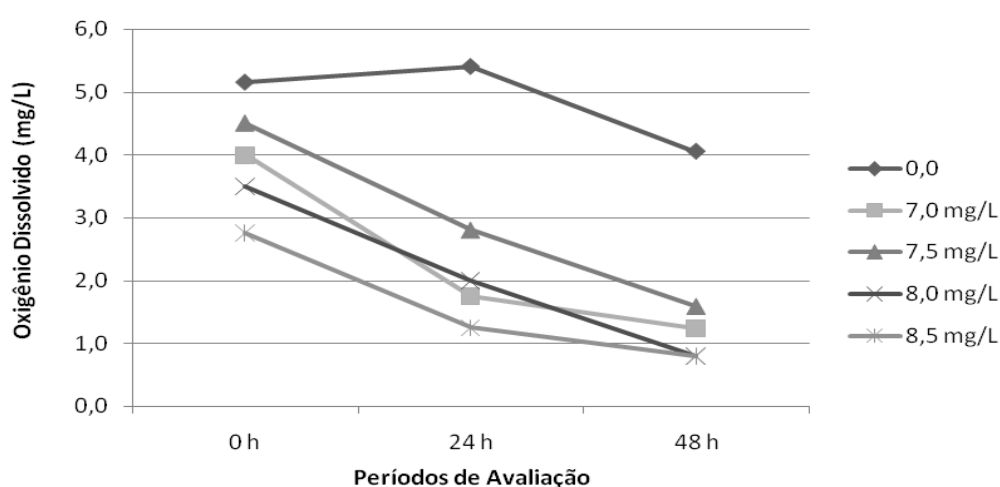
O risco de intoxicação ambiental para o pacu devido ao uso da OTC é menor do que para *O. latipes* (Boxall et al., 2003; Park e Choi, 2008); do que dos antibióticos mecilinam e trimetropina para *D. rerio* (Halling-Sørensen et al., 2000) e que da ciprofloxacina para *D. rerio* (Halling-Sørensen et al., 2000).

O FFC não apresenta risco de intoxicação ambiental para o pacu, assim como, foi considerado sem risco de intoxicação ambiental para *O. mykiss*, *L. macrochirus*, *D. magna*, *S. capricornutum* e *B. subtilis* (Schering-Plough, 2009).

## 5.2 Variáveis de qualidade de água durante os testes de toxicidade aguda

Nos testes de toxicidade do FFC as variáveis de qualidade de água não foram alteradas. O oxigênio dissolvido na água foi de  $4,09 \pm 1,96 \text{ mgL}^{-1}$  no tratamento controle e  $4,12 \pm 1,36 \text{ mgL}^{-1}$  na maior concentração de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$ ; a temperatura de  $26,62 \text{ }^\circ\text{C}$  no controle e  $26,53^\circ\text{C}$  na concentração de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$ ; o pH de  $7,45 \pm 0,79$  no controle, e  $7,67 \pm 0,63$  na concentração de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  e a condutividade elétrica de  $0,134 \pm 37,57 \text{ } \mu\text{Scm}^{-1}$  no controle, e  $0,138 \pm 31,02 \text{ } \mu\text{Scm}^{-1}$  na concentração de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$ .

Nos testes de toxicidade aguda com a OTC, somente o teor de oxigênio dissolvido na água foi alterado, em que foi reduzido de forma inversamente proporcional às concentrações da OTC. O teor de oxigênio nas águas foi reduzido de  $4,87 \pm 0,71 \text{ mgL}^{-1}$  no tratamento controle para  $1,60 \pm 1,02 \text{ mgL}^{-1}$  na maior concentração de  $8,5 \text{ mgL}^{-1}$  (Figura 7). As demais variáveis de qualidade de água não foram alteradas. A temperatura média das águas foi de  $26,57 \pm 1,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$  no controle e de  $26,20 \pm 0,85 \text{ }^{\circ}\text{C}$  na concentração de  $8,5 \text{ mgL}^{-1}$ ; o pH de  $7,64 \pm 0,05$ , no controle e  $7,70 \pm 0,52$ , na concentração de  $8,5 \text{ mgL}^{-1}$  e a condutividade elétrica, de  $0,154 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{Scm}^{-1}$  no controle e  $0,147 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{Scm}^{-1}$  na concentração de  $8,5 \text{ mgL}^{-1}$ .



**Figura 7.** Variação média de oxigênio dissolvido dos dois testes de toxicidade aguda com OTC para o pacu.

Segundo Rach et al. (2008), durante banho terapêutico ( $10,0$  e  $20,0 \text{ mL}^{-1}$ ), a OTC não alterou as variáveis de qualidade de água e o oxigênio foi de  $7,0 \text{ mgL}^{-1}$ , diferentemente do presente trabalho.

A mortalidade durante o teste com OTC ocorreu pela toxicidade do antibiótico e não pela baixa concentração de oxigênio, pois na menor concentração testada ( $7,0 \text{ mgL}^{-1}$ ) o oxigênio também estava próximo de  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  e ocorreu somente 5,55% de mortalidade, diferindo do observado na maior concentração ( $8,5 \text{ mgL}^{-1}$ ), com 100% de mortalidade dos animais e com o oxigênio também à  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ .

A sobrevivência do pacu em baixas concentrações de oxigênio durante os testes de toxicidade aguda pode ser atribuída ao fato de ser uma espécie do Pantanal Sul Americano que

suporta diversas concentrações de oxigênio que se alteram em pulsos de inundação, suportando concentrações de oxigênio menores que  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  (Bastos et al., 2007).

### 5.3 Reisolamento da *Aeromonas hydrophila*

As amostras coletadas submetidas aos testes bioquímicos comprovaram que a bactéria utilizada neste estudo é *Aeromonas hydrophila*.

As culturas apresentaram crescimento em meio TSA líquido. As colônias que cresceram em TSA foram transferidas para placas com ágar vermelho de fenol e ágar dextrina. As colônias sugestivas de *Aeromonas* sp. apresentaram-se amareladas, com halo transparente devido à hidrólise do amido (ágar vermelho de fenol) ou da hidrólise da dextrina (ágar dextrina). Paralelamente, nas amostras que comprovaram ser Gram-negativas, foi observado que as culturas se apresentavam na forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas.

Em TSI as culturas apresentaram reação ácida tanto na base como no bisel com formação de gás. As amostras mantidas em TSA para crescimento foram submetidas às provas da motilidade e, as que foram positivas, apresentaram crescimento em toda a extensão do tubo. Ainda, nos testes oxidase, as amostras foram positivas, com característica de esfregaços róseos, o que comprova ser do gênero *Aeromonas*.

Após estes testes, iniciaram-se os testes para a comprovação da espécie. Nas provas com esculina foi observada a coloração alaranjada e o teste de produção de gás foi positivo. No teste VP a coloração foi rósea e com arabinose foi amarela. Pelas provas bioquímicas descritas constata-se que a espécie utilizada nesse estudo é *A. hydrophila*.

### 5.4 Eficácia da OTC e do FFC no controle de infecção por *A. hydrophila*

Após o tratamento com os antibióticos, observa-se redução dos principais sinais clínicos (Tabela 4). Os sinais clínicos: avermelhamento da periferia da ferida e erosão da pele foram os que ainda permaneceram em alguns animais no controle com infecção e nos tratamentos com OTC. Isso pode ser explicado pelo não controle de *A. hydrophila* pela OTC, conforme observa-se também no tratamento controle com infecção e não medicado. As lesões não foram totalmente cicatrizadas.

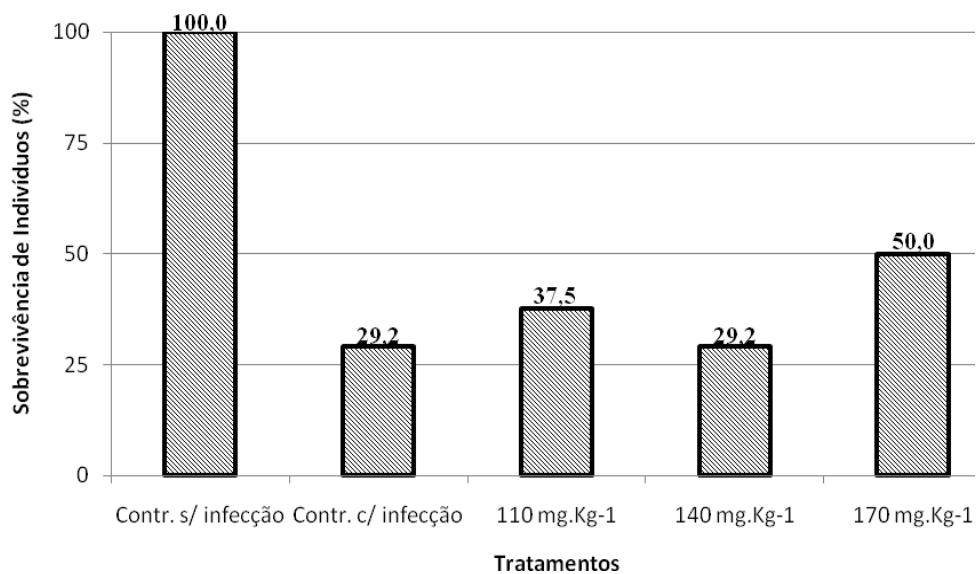
**Tabela 4.** Sinais clínicos remanescentes causados por *A. hydrophila* em pacus após os tratamentos com OTC ou FFC.

Sinais Clínicos	Réplicas	Controle		FFC (mgkg <sup>-1</sup> )			OTC (mgkg <sup>-1</sup> )		
		CSI	CCI	5,0	10,0	15,0	110,0	140,0	170,0
Distensão do celoma (acúmulo de líquido ascítico)	A	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0	0	0
Lesões bilaterais esbranquiçadas ou avermelhadas com erosão da pele	A	0	x	0	0	0	x	0	0
	B	0	0	0	0	0	0	x	x
	C	0	0	0	0	0	0	0	0
Corrosão da nadadeira caudal	A	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0	0	0
Avermelhamento da periferia das lesões epidérmicas	A	0	x	0	0	0	x	x	0
	B	0	x	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	x	0	0	0	0	x
Exoftalmia	A	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0	0	0
Fígado Friável e Ictérico	A	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0	0	0

CSI = controle sem infecção; CCI = controle com infecção; 0 = não ocorreu; x = ocorreu

No teste com OTC após uma hora do arraçoamento, período em que a ração ficava disponível, foi observado sobra considerável de alimento, o que indica baixa ingestão de ração pelos peixes.

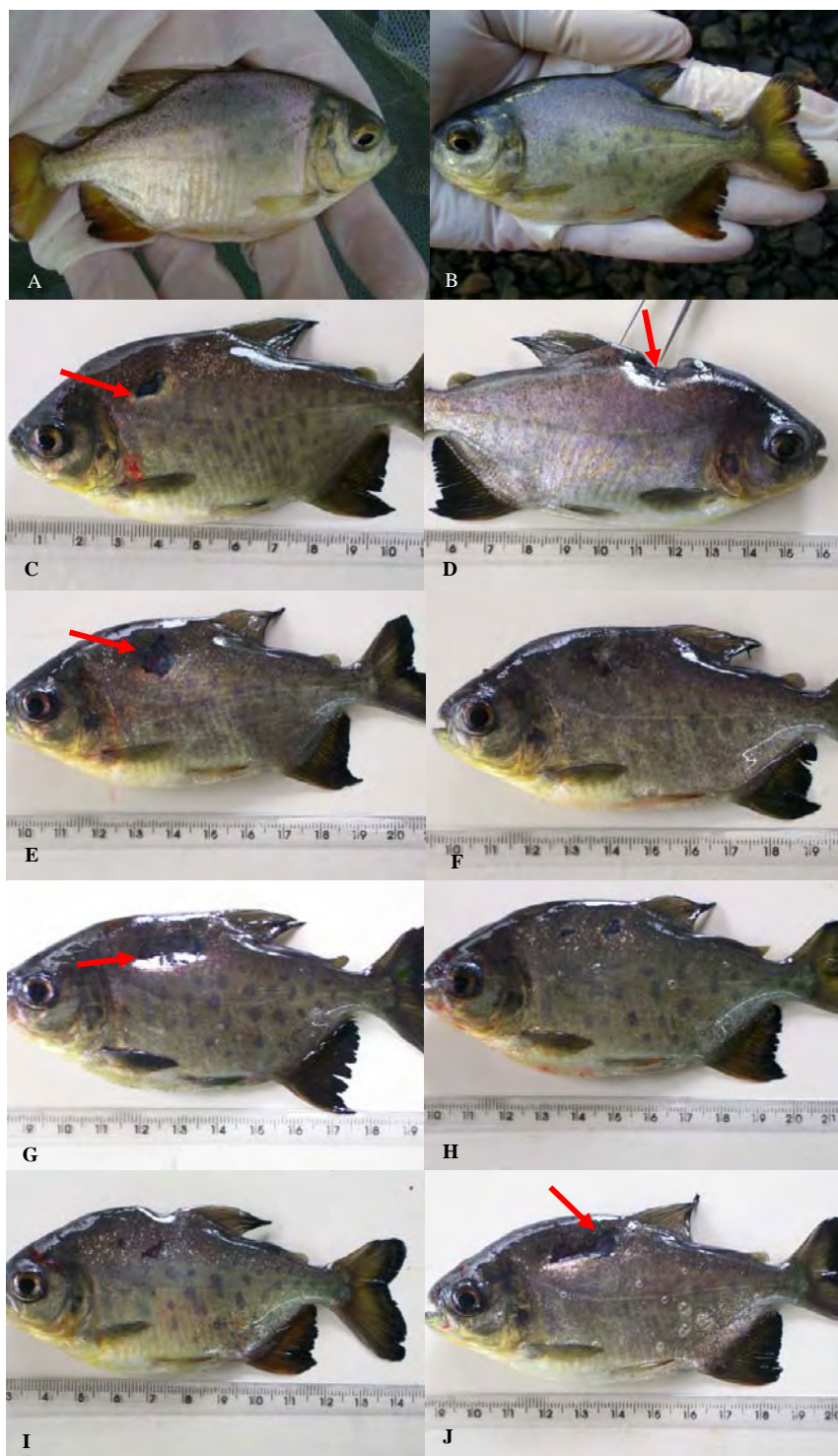
Após os sete dias de alimentação com a ração observa-se que no controle sem infecção ocorreu 100% de sobrevivência; no controle com infecção, 29,17%; em 110,0 mgkg<sup>-1</sup>, 37,5%; em 140,0 mgkg<sup>-1</sup>, 29,17% e em 170,0 mgkg<sup>-1</sup>, 50,0% (Figura 8).



**Figura 8.** Sobrevivência de pacu sete dias após tratamento com OTC administrada na ração.

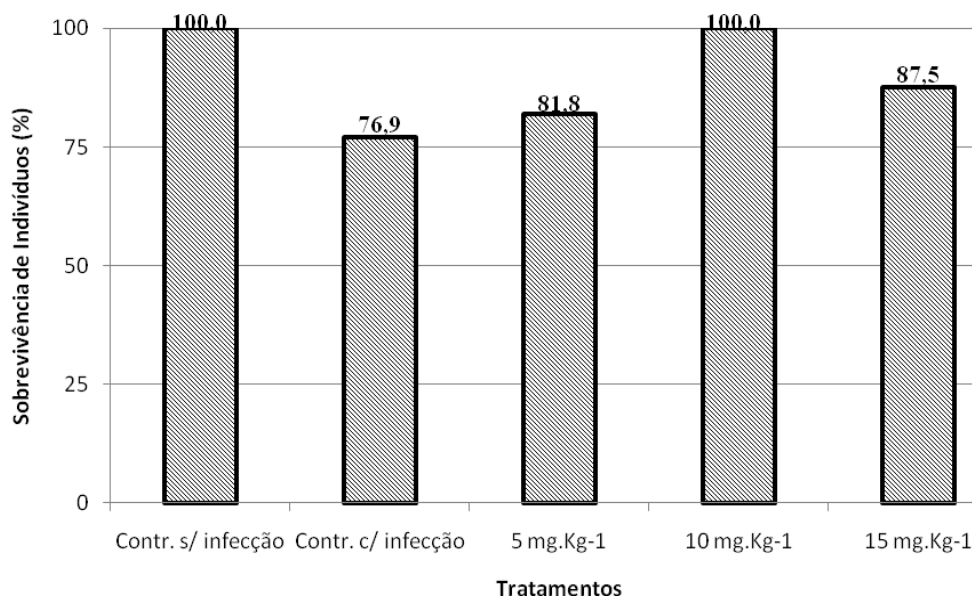
Durante o tratamento com FFC, somente durante o primeiro e segundo dia de alimentação, ocorreu pequena sobra de ração. Após esse período, não foi observada sobra de alimento, em que os peixes consumiram toda a ração fornecida (2,0%).

Na figura 9 observa-se as lesões cutâneas após inoculação de *A. hydrophila* e a cicatrização das lesões após dez dias de tratamento com FFC em todas as concentrações.



**Figura 9.** Indivíduos de pacus após dez dias de tratamento com FFC. Em A e B: Controle sem infecção, C e D: Controle com infecção, E e F: 5,0 mgFFCkg<sup>-1</sup>, G e H: 10,0 mgFFCkg<sup>-1</sup>, I e J: 15,0 mgFFCkg<sup>-1</sup>. Seta: lesões bilaterais causadas pela bactéria.

No tratamento controle sem infecção ocorreu 100% de sobrevivência após dez dias de alimentação; no tratamento controle com infecção, 76,9%; no tratamento com 5,0 mgFFCkg<sup>-1</sup>, 81,81%; com 10,0 mgFFCkg<sup>-1</sup>, 100% e com 15,0 mgFFCkg<sup>-1</sup>, 87,5% (Figura 10).



**Figura 10.** Sobrevivência de indivíduos após tratamento com FFC.

No experimento com OTC ocorreu sobra de ração nas unidades experimentais, o que caracteriza ao baixo consumo e conseqüentemente baixa eficácia do antibiótico com a maior sobrevivência (50,0%) em 170,0 mgkg<sup>-1</sup>. Para Rigos et al. (1999) ração adicionada de OTC com 5% de óleo apresenta baixa palatabilidade para *Dicentrarchus labrax* o que pode também ter ocorrido com a ração utilizada neste estudo. Segundo esses autores a palatabilidade é maior quando a OTC é inclusa durante a preparação da ração.

A utilidade terapêutica do antibiótico depende da quantidade de fármaco administrada capaz de atingir, na concentração necessária, o sítio desejado (Barreiro et al., 1996). Isso pode explicar a baixa eficácia da OTC no presente trabalho, na qual pela baixa ingestão da ração medicada, não chegou ao sítio de ação a quantidade necessária para exercer a atividade terapêutica prevista para controle da bactéria.

A OTC foi 100% eficaz para o controle de bacteriose em outras espécies de peixes: em *Salvelinus fontinalis* para tratar úlcera, na concentração de 75 mgkg<sup>-1</sup> (Snieszko et al., 1951); para *I. punctatus* para tratar aeromonose, na concentração de 50,0 mgkg<sup>-1</sup> (US GPO, 1986) e em *I. punctatus* no tratamento de *F. columnare*, na concentração de 80,0 mgkg<sup>-1</sup> (Tomas-Jinu e

Goodwin, 2004). Porém, neste trabalho a maior eficácia observada foi de 50% com a concentração de  $170,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  de ração.

A OTC é indicada na aquicultura para o controle de doenças bacterianas em vários países. As concentrações recomendadas estão entre  $50,0 \text{ mgkg}^{-1}$  a  $1750 \text{ mgkg}^{-1}$  (Scott, 1993; Namdari et al., 1996; FDA, 1998; Ueno et al., 2004; Wang e Li, 2004), dependendo da bactéria, da espécie de peixe e das variáveis físico químicas da água. Verifica-se neste estudo que mesmo utilizando concentrações entre esse intervalo de concentração, não foi obtida eficácia no controle de *A. hydrophila* em pacu.

A sobrevivência foi maior em pacu tratado com  $10,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$  (100%) do que em salmão para tratar *A. salmonicida* (87%) (Inglis et al., 2006). Para o controle de *Streptococcus iniae* em *Morone chrysops* x *M. saxatilis* a eficácia com esta concentração de FFC foi menor (69,2%) do que para o pacu, porém com  $5,0 \text{ mgkg}^{-1}$  e  $15,0 \text{ mgkg}^{-1}$ , a eficácia foi maior (86,7% e 94,2%, respectivamente) do que para o tratamento de aeromonose em pacu (Darwish, 2007), o que demonstra que a concentração eficaz de tratamento de *S. iniae* está entre  $10,0$  e  $15,0 \text{ mgkg}^{-1}$ , enquanto que, para o pacu,  $10 \text{ mgkg}^{-1}$ .

A concentração eficaz de FFC está de acordo com a indicada para *I. punctatus* para tratar *E. ictaluri* (Gaikowski et al., 2003; Schering-Plough, 2009); para salmão para tratar furunculoses (Inglis et al., 2006; Nordmo et al., 2006); para *G. morhua* para tratar vibriose (Seljestokken et al., 2006) e para *O. niloticus*, para tratar *A. hydrophila* (Schering-Plough, 2009).

### **5.5 Variáveis de qualidade de água durante tratamento com OTC e FFC**

As variáveis de qualidade de água não foram alteradas durante o tratamento com os dois antibióticos, e os valores relativos ao tratamento com OTC estão apresentados na Tabela 5 e com FFC, na Tabela 6. O fluxo de água foi mantido à  $9 \text{ mls}^{-1}$  durante todo o tratamento, havendo portanto, renovação da água.

**Tabela 5.** Valores médios das variáveis de qualidade de água durante tratamento com OTC.

Variáveis		Tratamentos (mgkg <sup>-1</sup> )				
		Controle sem infecção	Controle com infecção	110,0	140,0	170,0
Temperatura	M*	25,7±3,64	25,88±3,25	25,85±3,10	25,70±2,98	25,87±3,21
	T*	27,55±1,78	27,33±1,86	27,38±1,87	27,42±1,79	27,3±1,86
PH	M	7,26±0,51	7,35±0,47	7,30±0,48	7,33±0,46	7,31±0,50
	T	7,12±0,13	7,18±0,23	7,22±0,26	7,18±0,20	7,16±0,26
O <sub>2</sub> D (mgL <sup>-1</sup> )	M	7,2±2,26	8,11±2,19	8,48±2,37	7,98±2,35	8,05±2,57
	T	5,59±0,76	6,0±2,02	6,19±1,35	5,81±1,32	5,85±1,58
O <sub>2</sub> D (%)	M	96,0±34	101,88±33,26	102,78±39,09	100,61±34,48	99,58±36,63
	T	75,63±6,54	76,37±27,26	78,40±24,56	73,25±17,96	74,7±22,55
Cond. Elétrica (µScm <sup>-1</sup> )	M	0,176±0,014	0,179±0,012	0,180±0,011	0,178±0,011	0,180±0,011
	T	0,185±0,008	0,186±0,008	0,186±0,066	0,184±0,008	0,187±0,006

M\*: manhã; T\*: tarde

**Tabela 6.** Valores médios das variáveis de qualidade de água durante tratamento com FFC.

Variáveis		Tratamentos (mgkg <sup>-1</sup> )				
		Controle sem infecção	Controle com infecção	5,0	10,0	15,0
Temperatura (°C)	M*	28,19±1,30	28,11±1,10	28,09±1,23	27,99±1,03	27,95±1,15
	T*	31,65±1,08	31,76±0,98	31,90±1,00	31,44±0,98	31,85±1,08
pH	M	7,58±0,67	7,70±0,57	7,53±0,45	7,63±0,54	7,56±0,56
	T	7,50±0,29	7,75±0,48	7,60±0,44	7,62±0,36	7,58±0,41
O <sub>2</sub> D (mgL <sup>-1</sup> )	M	10,0±1,38	10,65±1,98	9,58±1,64	10,63±1,48	10,45±1,65
	T	7,70±0,66	8,48±2,61	8,53±1,51	8,67±1,48	8,18±1,30
O <sub>2</sub> D (%)	M	127,75±21,32	137,98±22,56	124,73±22,23	133,45±24,66	132,33±25,8
	T	104,95±10,13	126,22±19,43	114,90±20,74	112,8±16,96	111,93±19,09
Cond. Elétrica (µScm <sup>-1</sup> )	M	0,175±0,0005	0,178±0,008	0,179±0,0006	0,179±0,009	0,180±0,009
	T	0,192±0,012	0,189±0,013	0,190±0,013	0,190±0,010	0,191±0,011

M\*: manhã; T\*: tarde

Segundo Svobodová et al., (2006) e Sanchez-Martínez et al., (2008) a alimentação com ração medicada com 50,0 e 1500 mgOTCkg<sup>-1</sup> não alterou as variáveis de qualidade de água. Rach

et al., (2008) também avaliou as variáveis de qualidade de água durante tratamento por meio de banho terapêutico (10,0 e 20,0 mgOTCL<sup>-1</sup>) e não observaram alterações significativas.

Durante o tratamento com OTC, a amônia não foi significativamente alterada e variou de 190,60 µg.L<sup>-1</sup>, no tratamento controle, a 106,40 µg.L<sup>-1</sup>, em 170,0 mgkg<sup>-1</sup> (Tabela 7).

**Tabela 7.** Média da concentração de amônia (µg.L<sup>-1</sup>) e desvio padrão (DP) após sete dias de tratamento com OTC.

Tratamentos	NH <sub>3</sub> (µg.L <sup>-1</sup> )	DP
Controle sem infecção	190,60	6,48
Controle com infecção	167,63	28,11
110,0 mgkg <sup>-1</sup>	144,37	19,72
140,0 mgkg <sup>-1</sup>	163,00	5,86
170,0 mgkg <sup>-1</sup>	106,40	4,61

Durante o tratamento com FFC, a amônia também não foi alterada significativamente pelos tratamentos. Os valores variaram de 100,63 ± 82,25 µg.L<sup>-1</sup>, no controle sem infecção a 80,77 ± 89,96 µg.L<sup>-1</sup> com 15,0 mgkg<sup>-1</sup> (Tabela 8).

**Tabela 8.** Média da concentração de amônia (µg.L<sup>-1</sup>) e desvio padrão (DP) após dez dias de tratamento com FFC.

Tratamentos	NH <sub>3</sub> (µg.L <sup>-1</sup> )	DP
Controle sem infecção	100,63	82,25
Controle com infecção	54,30	46,88
5,0 mgkg <sup>-1</sup>	84,57	96,25
10,0 mgkg <sup>-1</sup>	111,13	120,01
15,0 mgkg <sup>-1</sup>	80,77	89,96

Segundo Sanchez-Martínez et al., (2008) durante administração de 50,0 mgOTCkg<sup>-1</sup> em *I. punctatus*, a amônia se manteve abaixo de 1,0 mg.L<sup>-1</sup>. Gaikowski et al. (2003) também não observaram alteração nas concentrações de amônia durante administração de FFC.

Os valores observados nos experimentos não são tóxicos para os organismos aquáticos e estão dentro dos padrões estabelecidos pelo CONAMA (357) para águas de classe II, cujo o limite estabelecido para nitrogênio amoniacal, de  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ , para esse intervalo de pH (entre 7,5 e 8,5).

## 5.6 Histopatologia após tratamento de *A. hydrophila* com OTC e com FFC

### 5.6.1 Pele

A pele de pacu (controle) apresenta epiderme constituída por três camadas de células pavimentosas com núcleos centrais, células mucosas secretoras de muco substâncias e cromatóforos abaixo da epiderme. As escamas estão implantadas abaixo da epiderme atingindo a derme. A derme é formada por uma espessa camada de tecido conectivo modelado com fibras colágenas dispostas horizontalmente (Figura 11A).

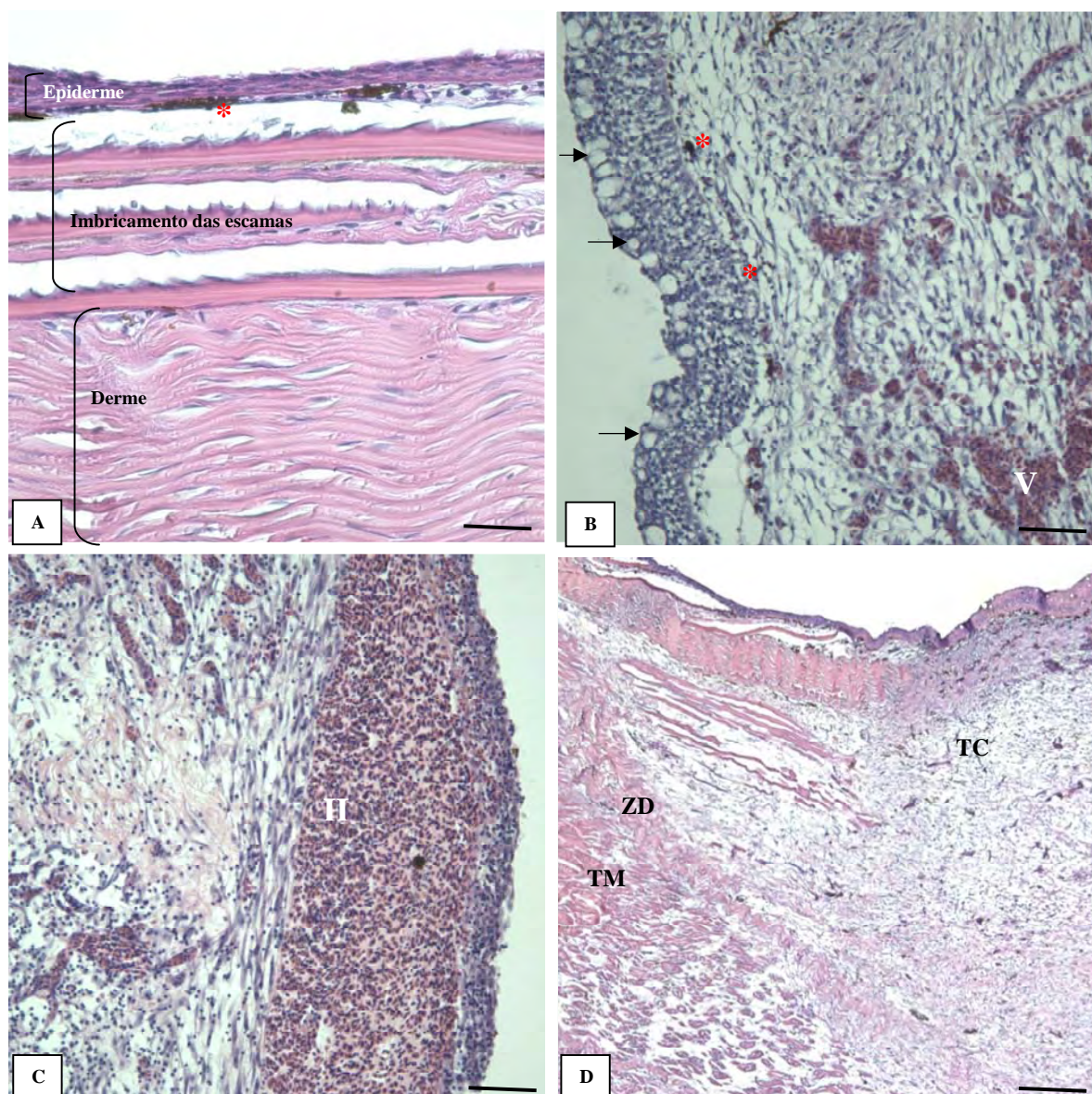
No tratamento controle com infecção ocorreu reorganização do epitélio, hiperplasia da epiderme e hipertrofia das células mucosas e formação de uma camada de células basais que delimita a epiderme e a derme. Observa-se cromatóforos na região epidérmica e no local da lesão (derme e tecido muscular) ocorre tecido conectivo e intensa vascularização (Figura 11B e C).

No tratamento com  $110,0$ ;  $140,0$  e  $170,0 \text{ mgOTCkg}^{-1}$  as características histológicas observadas são as mesmas que as observadas no controle com infecção (Figura 11B e C).

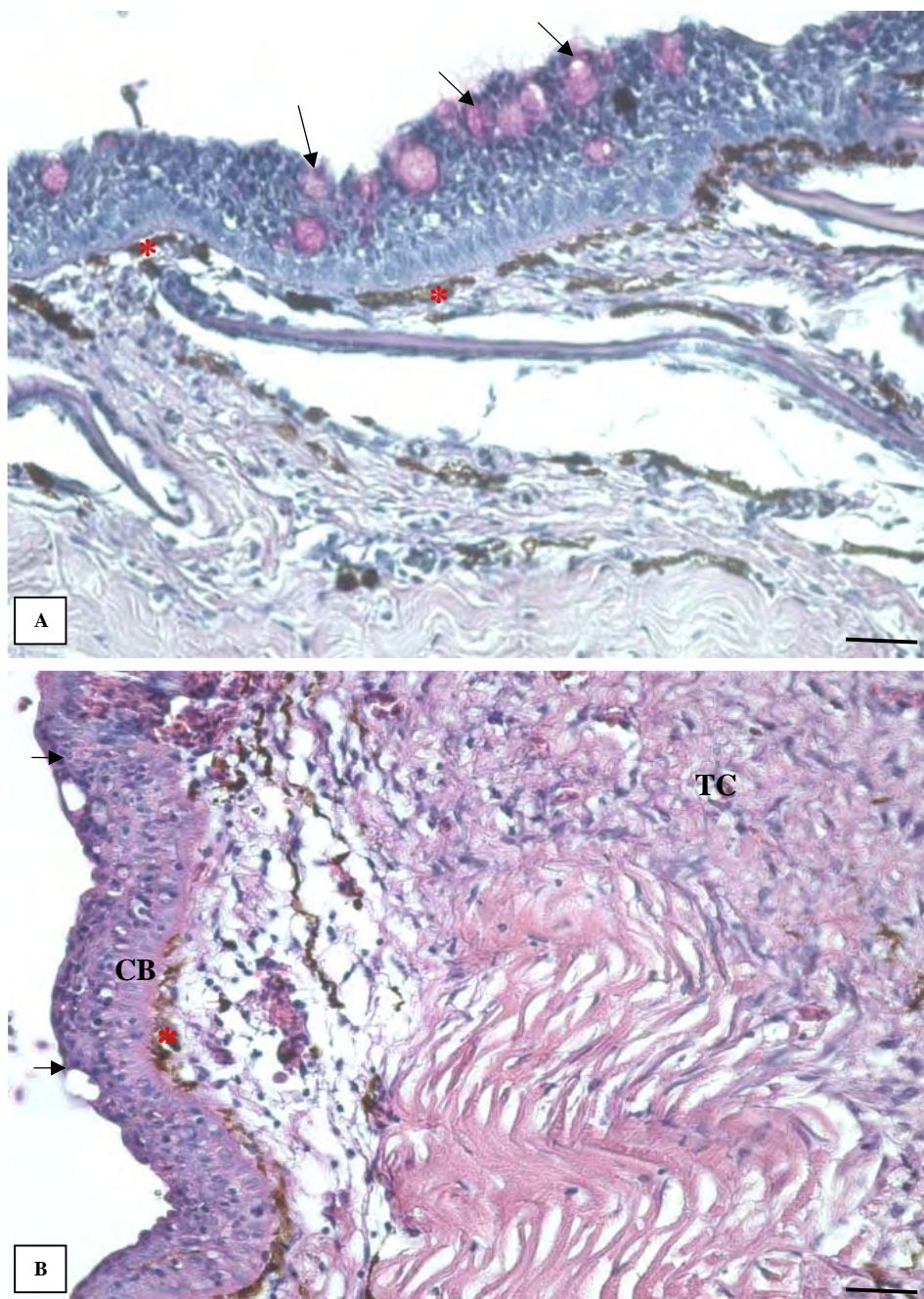
No tratamento de  $5,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$ , em alguns animais a lesão causada pela bactéria encontra-se com exposição do tecido muscular, o que demonstra uma recuperação mais tardia do local da lesão. As características histológicas do processo de cicatrização são as mesmas observadas no controle com infecção (Figura 12 A e B).

No tratamento com  $10,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$  a maioria dos locais onde ocorreu a lesão cutânea encontra-se em processo de reorganização das camadas da pele e apresenta características próximas às do controle sem infecção, mas com pequena secreção de muco pelas células mucosas. Em outros peixes o processo de cicatrização está mais atrasado e as características são as mesmas observadas no controle com infecção.

No tratamento com  $15,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$  os animais apresentaram características histológicas semelhante ao controle sem infecção porém alguns peixes apresentaram cicatrização mais lenta, demonstrando as características do controle com infecção.



**Figura 11.** Fotomicrografia de cortes transversais de pele de pacu coletado após sete dias de tratamento com OTC ou com dez dias com FFC. A. Controle sem infecção, demonstrando as camadas da pele e o imbricamento dérmico das escamas. Asterisco: cromatóforos. Barra 1cm = 34,5  $\mu$ m. B: Após tratamento de *A. hydrophila* com 140 mgOTCkg<sup>-1</sup>, após oito dias de indução de infecção experimental. Seta: células mucosas; V: vasos Barra 1cm = 34,5  $\mu$ m. C: 170,0 mgOTCkg<sup>-1</sup>; II: infiltrado inflamatório. Barra 1cm = 34,5  $\mu$ m. D: 10,0 mgFFCkg<sup>-1</sup>, local da lesão em cicatrização. TC: tecido conectivo; TM: tecido muscular; ZD: zona de delimitação da lesão. D, 276  $\mu$ m. Coloração HE.



**Figura 12.** Fotomicrografia de pele de pacu após dez dias de tratamento com FFC. A:  $5,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$ , células mucosas; Seta: células mucosas; Asterisco: cromatóforos. Coloração PAS. Em B:  $5,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$ , formação de camada de células basais na epiderme. Fase de reorganização do colágeno e preenchimento por tecido conectivo. CB: células basais; TC: tecido conectivo. Barras  $1 \text{ cm} = 13,8 \text{ }\mu\text{m}$ . B: Coloração HE.

A composição celular da pele de pacu (controle sem infecção) foi semelhante ao descrito em outros estudos (Contreras-Gusmán, 1994; Moraes, et al., 2003; Souza et al., 2003; Bortoluzzi, 2009). Os tratamentos com OTC (110,0; 140,0; 170,0 mgkg<sup>-1</sup>) e o com 5,0 mgFFCkg<sup>-1</sup> induziram uma resposta tecidual semelhante no desenvolvimento da cicatrização local. Nos tratamentos com 10,0 e 15,0 mgFFCkg<sup>-1</sup>, alguns animais apresentaram características teciduais semelhantes ao controle com infecção, porém outros já apresentaram estrutura semelhante ao controle sem infecção, o que indica que com a utilização dessas concentrações o processo de cicatrização é mais rápido.

O processo de cicatrização consiste na reepitelização da ferida cutânea pelo crescimento compensatório que envolve hipertrofia e hiperplasia celular, reorganização o tecido conectivo dérmico e visando restaurar a estrutura tissular do órgão (Robbins e Cotran, 2004). Em peixes, a reepitelização ocorre por expansão das células sadias da epiderme vizinha, e é importante para evitar o desequilíbrio osmótico, proteger o peixe contra agressão por patógenos oportunistas (Moraes et al., 2003). Nesse trabalho também foram observadas algumas etapas do processo cicatricial como a reorganização dos tecidos e reepitelização do local lesado pela bactéria. Após dez dias de tratamento na concentração de 10,0 mg FFCkg<sup>-1</sup> ocorreu evolução do processo cicatricial.

Após oito dias (OTC) ou onze dias da infecção (FFC) por *A. hydrophila* observa-se a organização epidérmica e dérmica. Iwashita (2008) após sete dias da indução de ferida em *O. niloticus*, também observou essas características de cicatrização.

A reepitelização em pacu é acompanhada por hiperplasia das células mucosas com produção de muco substâncias. Iger e Abraham (1990) afirmam que as células mucosas sintetizam muco e, neste processo, se unem e migram em direção à superfície da pele e descarregam seu conteúdo, o que a torna viscosa. Segundo Van der Marel et al. (2010) o aumento na liberação de moléculas de mucina e a hiperplasia de células mucosas epidérmicas também foi observado em carpa (*Cyprinus carpio*) quando exposta a *A. hydrophila* na água, o que indica ser um mecanismo de defesa preliminar em resposta a exposição a agentes bacterianos.

A composição do muco pode variar de acordo com a localização no tecido do peixe. O muco apresenta macromoléculas gelificantes com alto peso molecular e assume-se que as macromoléculas predominantes são glicoproteínas (Al-Banaw et al., 2010).

Nos tratamentos com OTC e FFC ocorreu reepitelização ao final do tratamento (7 dias com OTC e 10 dias com FFC) e somente com  $5,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$  foi observado alguns organismos com exposição da musculatura. A reepitelização em tilápia (*O. niloticus*) também foi observada após sete dias da indução de ferida cirúrgica testando suplementação com vitamina C na cicatrização epidérmica (Iwashita, 2008). Segundo Moraes et al., (2003) em pacu a reepitelização ocorre em 24 horas após a produção da ferida, não por mitoses, mas por expansão das células epidérmicas vizinhas.

### 5.6.2 Brânquias

As brânquias de pacu (controle sem infecção) são constituídas por arcos branquiais que suportam filamentos branquiais compostos de lamela primária e suportam as lamelas secundárias. Os arcos braquiais e a lamela primária são compostos por tecido cartilaginoso e conectivo. A lamela secundária é constituída por células cloreto, pilares, mucosas e de revestimento (Figura 13A).

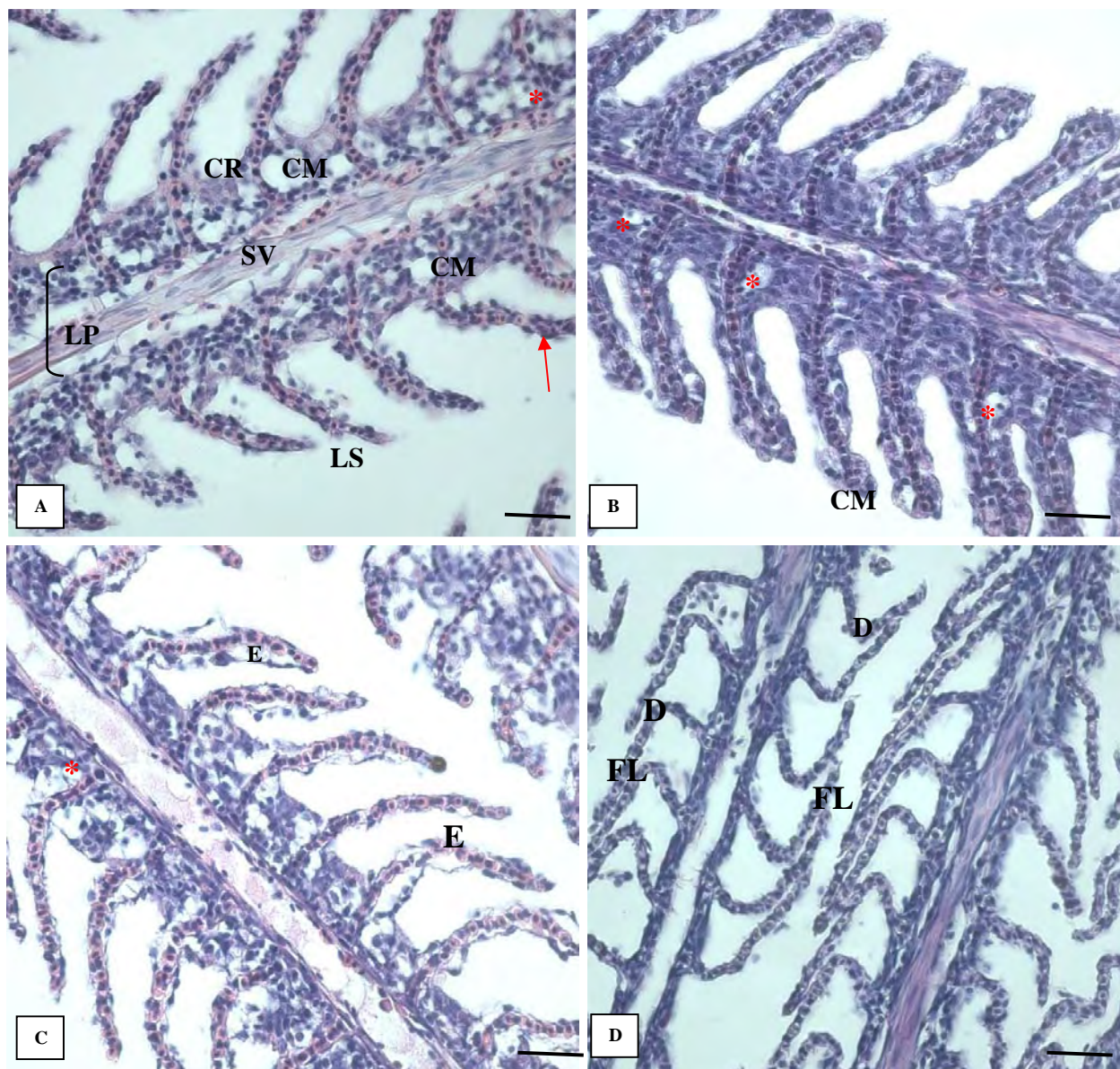
No controle com infecção ocorreu hiperplasia e hipertrofia das células mucosas, cloreto e de revestimento e hiperplasia do epitélio interlamelar, o que aumenta a distância de difusão (Figura 12B).

Nos tratamentos com  $110,0$  e  $140,0 \text{ mgOTCkg}^{-1}$  ocorreram as mesmas alterações do controle com infecção e fusão lamelar. Nas lamelas secundárias ocorreu aneurisma em consequência da fragilidade vascular (Figura 13C).

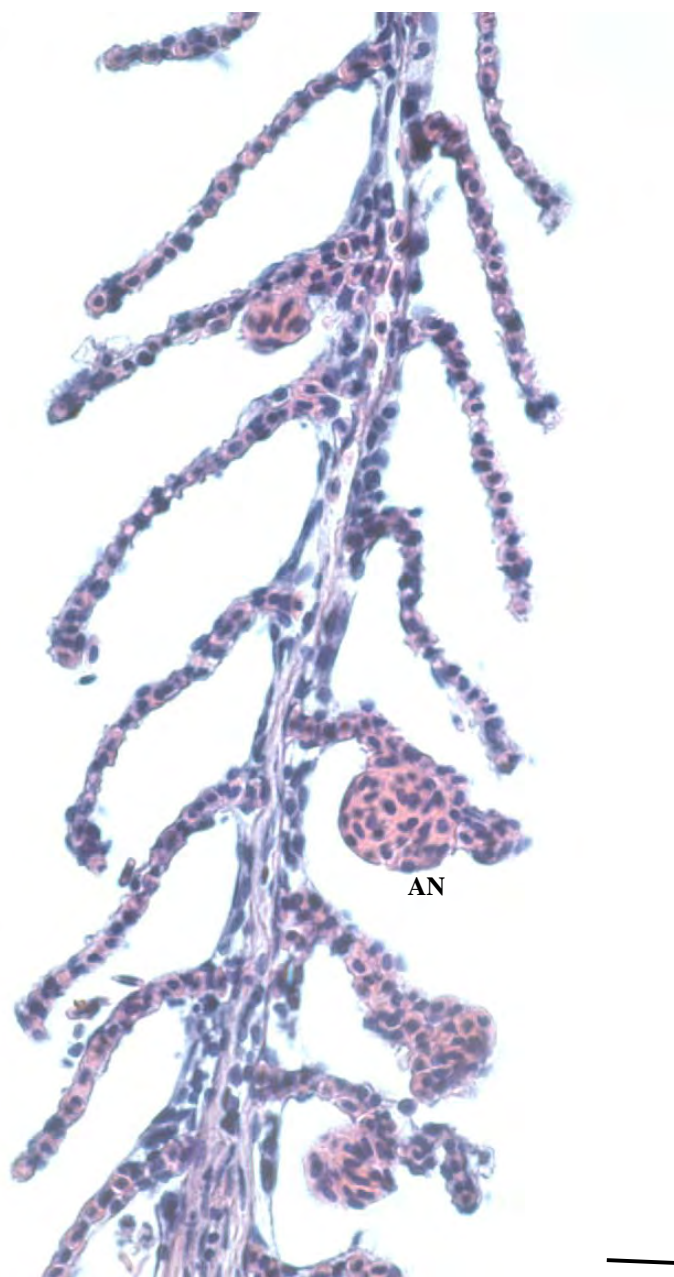
No tratamento com  $170,0 \text{ mgOTCkg}^{-1}$  as características teciduais foram as mesmas apresentadas nos tratamentos de  $110,0$  e  $140,0 \text{ mgOTCkg}^{-1}$  e edema subepitelial na lamela secundária (Figura 13C).

No tratamento com  $5,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$  ocorreu aneurisma, fusão apical das lamelas secundárias e hiperplasia das células de revestimento com aumento do epitélio interlamelar.

Nos tratamentos com  $10,0$  e  $15,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$  ocorreu aneurisma e fusão lamelar, porém com  $15,0 \text{ mgkg}^{-1}$  também observou-se desarranjo da estrutura de fibrina da lamela secundária (Figura 13D e 14).



**Figura 13.** Fotomicrografia de cortes transversais de brânquias de pacu após sete dias de tratamento com OTC ou dez dias com FFC. A: Controle sem infecção; LP: lamela primária; LS: lamela secundária; SVC: seio venoso central; CM: células mucosas, CR: células de revestimento; Seta: células pilares; Asterisco: células cloreto. B: Controle com infecção. C: Após tratamento de *A. hydrophila* com  $140 \text{ mgOTCkg}^{-1}$ ; E: edema subepitelial. D: Com  $15 \text{ mgFFCkg}^{-1}$ . D: desestruturação da estrutura de sustentação; FL: fusão lamelar apical. Barras de 1 cm:  $34,5 \mu\text{m}$ . Coloração HE.



**Figura 14.** Fotomicrografia de cortes transversais de brânquias de pacu após dez dias de tratamento com FFC ( $10,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$ ). AN: Aneurisma. Barra  $1\text{cm} = 34,5 \mu\text{m}$ . Coloração HE.

Após os tratamentos com OTC ou com FFC são observadas alterações estruturais nas brânquias de pacu, como ocorrência de fusão lamelar apical e pontos de aneurisma. Com 15,0 mgFFCkg<sup>-1</sup> ocorreu desarranjo das estruturas de sustentação das lamelas secundárias e com 110,0 e 140,0 mgOTCkg<sup>-1</sup>, edema subepitelial na lamela secundária. Exceto nos tratamentos com 10,0 e 15,0 mgFFCkg<sup>-1</sup>, todos os demais tratamentos causaram hiperplasia interlamelar, decorrente do aumento de células cloreto, mucosas e de revestimento.

Os aneurismas e a fusão lamelar podem ter sido causados pela presença de *A. hydrophila*, já que a concentração de oxigênio dissolvido estava ótima e os antibióticos estavam agregados à ração e não dissolvidos na água. Segundo Noga (1995) e Kobayashi et al. (2005) bactérias Gram-negativas, como *A. hydrophila*, causam fusão lamelar, aneurisma e hemorragia branquial em *Sebastes schlegeli*.

O aumento das células mucosas e células cloreto observadas neste trabalho, podem ter sido causadas pela bactéria *A. hydrophila*, pois Lee et al. (1996) destacam que essas mudanças podem ser causadas por agentes patológicos ou por presença de poluentes na água.

Segundo Mallatt (1985) o aumento do número de células mucosas provoca hipersecreção de muco, que visa à proteção da estrutura tecidual em situações ambientais adversas e em exposição a agentes tóxicos. As muco substâncias produzidas por estas células apresentam poliânions, que podem atuar como barreira protetora contra a penetração do xenobiótico ou patógeno no epitélio respiratório do pacu. Esse mecanismo de defesa foi observado nos pacus como forma de proteção do epitélio branquial contra a bactéria.

A fusão lamelar ocorre devido ao aumento da adesão entre as células epiteliais e o sistema de sustentação das células pilares, acompanhado pelo colapso da integridade da estrutura da lamela secundária (Skimore e Tovell, 1972).

Durante o processo respiratório, o fluxo de água que entra pela boca do peixe leva consigo agentes irritantes e patógenos. Esses agentes, em altas concentrações, entram em contato com as brânquias e alteram a forma dos filamentos branquiais e das lamelas respiratórias (Luvizotto, 1994).

A desorganização da estrutura branquial conduz a uma menor eficiência na absorção de oxigênio, devido ao aumento da distância de difusão lamelar (Roberts, 1981; Fanta et al. 2003).

### 5.6.3 Fígado

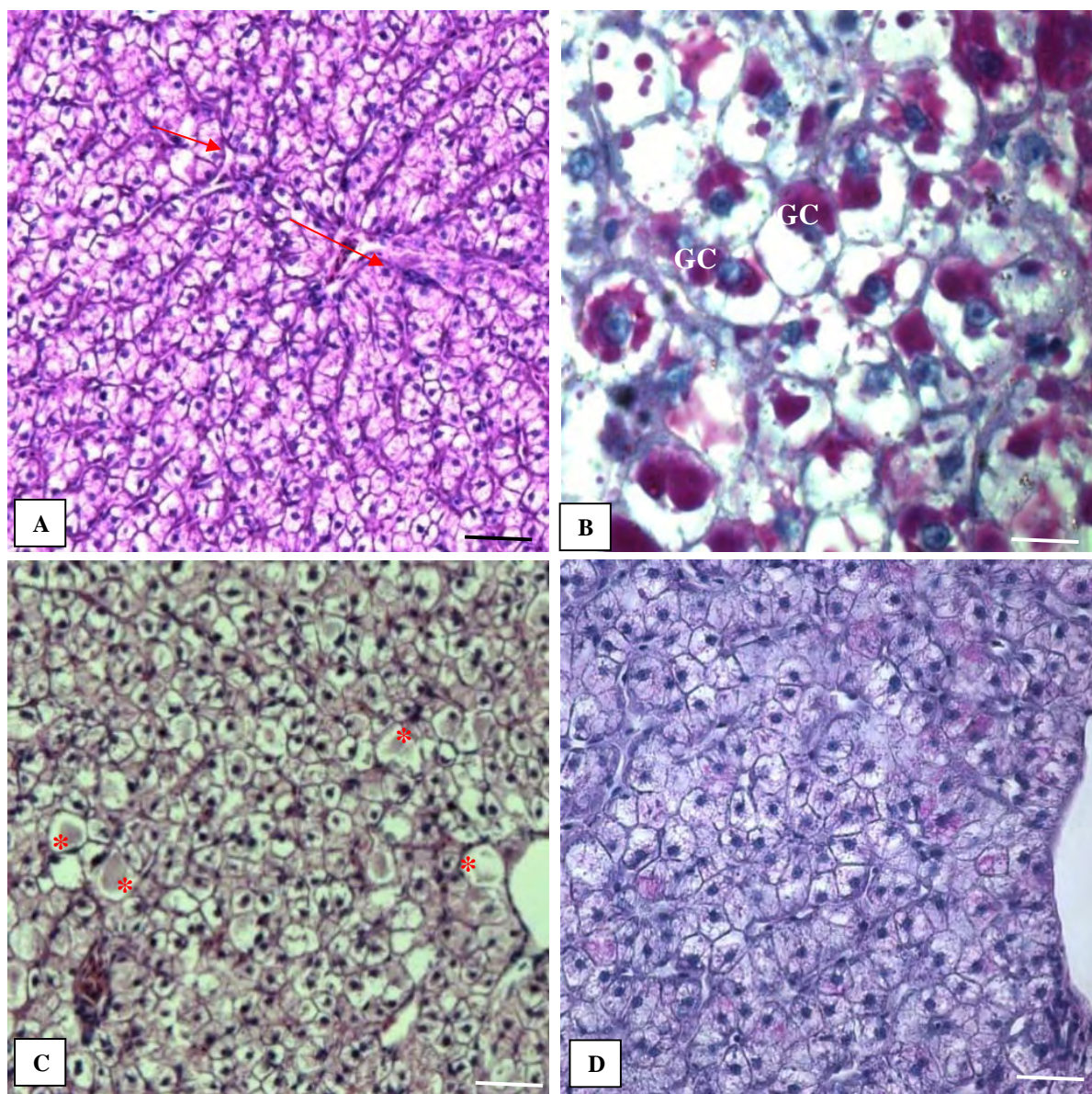
No controle sem infecção, o fígado de pacu é constituído por capilares sinusóides e hepatócitos em arranjo cordonal. Os hepatócitos têm formato hexagonal, citoplasma claro (acidófilo), presença de glicogênio e o núcleo levemente deslocado para a periferia da célula. Há presença do hepatopâncreas organizado no entorno das veias centrais (Figura 15A, B).

No controle com infecção os hepatócitos apresentaram hipertrofia, citoplasma claro, núcleo deslocado para a periferia e menor quantidade de glicogênio com relação ao observado no controle.

No tratamento com  $110,0 \text{ mgOTCkg}^{-1}$  a composição geral dos tecidos é semelhante à observada no controle com infecção porém com ausência de glicogênio nos hepatócios.

Com  $140,0$  e  $170,0 \text{ mgOTCkg}^{-1}$  as composição dos tecidos é semelhante à que foi observada no controle com infecção.

No tratamento com  $5,0$ ;  $10,0$  e  $15,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$  ocorreu hipertrofia dos hepatócitos, observa-se citoplasma claro e o núcleo deslocado para a periferia. Com  $5,0 \text{ mgFFCkg}^{-1}$  os hepatócitos apresentam acúmulo de glicogênio e em  $10,0$  e  $15,0 \text{ mgkg}^{-1}$  observa-se presença de poucos grânulos de reserva e desarranjo cordonal dos hepatócitos em  $15,0 \text{ mgkg}^{-1}$  (Figuras 15C,D).



**Figura 15.** Fotomicrografia de cortes transversais de fígado de pacu após dez dias de tratamento de *A. hydrophila* com FFC. A: controle sem infecção, demonstrando o arranjo cordonal dos hepatócitos; Asterisco: hipertrofia; Seta: capilares sinusóides. Barra 1cm = 69,1  $\mu\text{m}$ . B: controle sem infecção, glicogênio nos hepatócitos; GC: glicogênio. Barra de 1cm = 13,8  $\mu\text{m}$ . C: 5,0  $\text{mgFFCkg}^{-1}$ , hipertrofia. Barra 1cm = 69,1  $\mu\text{m}$ . e em D: 15,0  $\text{mgFFCkg}^{-1}$ , ausência de glicogênio e desarranjo cordonal dos hepatócitos. Barra de 1 cm = 34,5  $\mu\text{m}$ . A e C: Coloração HE e B e D: Coloração PAS.

As composição celular normal do fígado de pacu (controle sem infecção) estão de acordo com as descritas em outros estudos científicos para peixes (Roberts, 1981; Akiyoshi e Inoue, 2004).

Nos tratamentos de com OTC e com FFC e no controle com infecção ocorreu hipertrofia dos hepatócitos decorrente do aumento no número de organelas responsáveis por metabolizar o antibiótico e as toxinas da bactéria. A presença de glicogênio armazenado foi verificada no controle sem infecção e no tratamento com 5,0 mgFFCkg<sup>-1</sup> e apenas pontos de grânulos de glicogênio nos demais tratamentos.

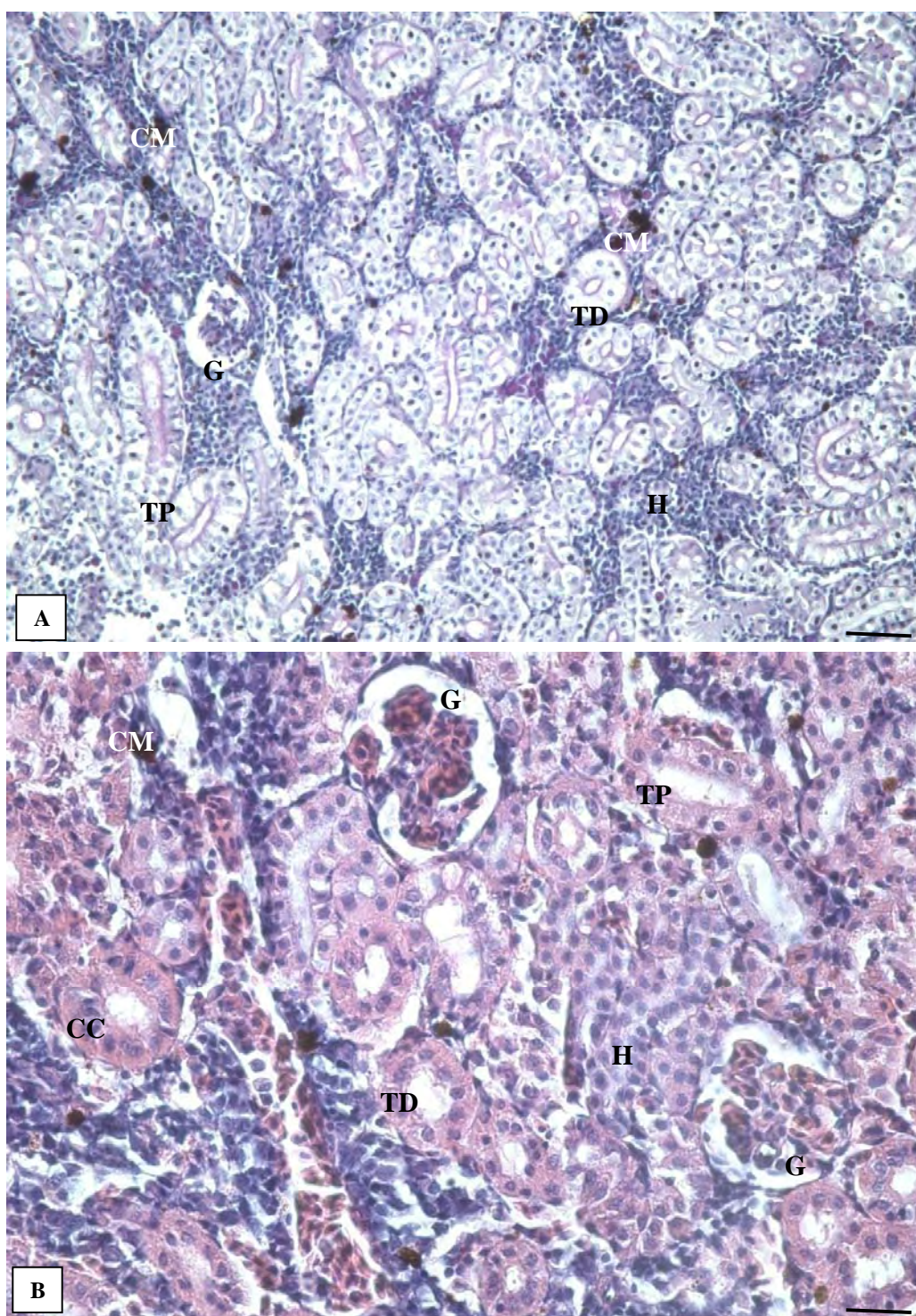
O acúmulo de glicogênio no controle sem infecção e no tratamento com 5,0 mgFFCkg<sup>-1</sup> indica uma ineficiência do uso desse material de reserva. A pequena presença de grânulos de glicogênio nos outros tratamentos indica utilização da glicose, talvez para metabolizar o antibiótico e paredes celulares das bactérias ou esse consumo de glicogênio hepático também pode ser decorrente do estresse causado pela presença da bactéria. Esse indicativo é acompanhado pela hipertrofia dos hepatócitos que indicam aumento da “maquinaria enzimática” para um aumento do metabolismo.

A OTC causa lesões no fígado, como necrose focal, após administração intramuscular por sete dias em *Tinca tinca* (Rijkers et al., 1980; Bruno, 1989; Soler et al., 1996), porém nesse estudo, os antibióticos administrados na ração, não causaram lesões no fígado.

#### 5.6.4 Rim

O rim de pacu é composto por túbulos proximais e distais e glomérulos. Entre essas estruturas estão centros melanomacrófagos, tecido hematopoiético e linfóide. O túbulo proximal apresentou epitélio com células cúbicas ciliadas e núcleos mais centrais. O túbulo distal apresentou células cúbicas ciliadas com núcleos mais basais. Nos túbulos proximais e distais localiza-se o glicocálix formada pela parte apical das células cúbicas ciliadas. O glomérulo é composto pela cápsula glomerular de Bowman's e por capilares fenestrados (Figura 16).

O controle com infecção, com 110,0; 140,0 e 170,0 mgOTCkg<sup>-1</sup> e com 5,0; 10,0 e 15,0 mgFFCkg<sup>-1</sup> observam-se as características histológicas similares às do tratamento controle sem infecção.



**Figura 16.** Fotomicrografia de cortes transversais de rim de pacu . A e B: controle sem infecção. TD: túbulo distal; TP: túbulo proximal; G: glomérulo; H: tecido hematopoiético; CM: centro melanomacrofágicos. A: Barras de 1cm = 69,1  $\mu$ m e em B: 34,5  $\mu$ m. Coloração HE.

A composição celular normal do rim de pacu está de acordo com a observada por Cruz (2005), na mesma espécie e por Grizzle e Rogers (1985) em *catfish* (*I. punctatus*).

A OTC causa necrose nos tecidos hematopoiéticos em *Cyprinus carpio* após administração de  $150,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Svobodová, 2006). Segundo Soler et al., (1996) a OTC causa necrose do epitélio tubular e do tecido hematopoiético renal de *Tinca tinca* após a administração intramuscular por sete dias. Neste trabalho foram utilizadas concentrações maiores e menores á  $150,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , porém não causaram alteração no tecido renal. A ausência de alteração nesses tecidos pode ser devido à baixa ingestão da ração pelos peixes, devido ao paladar inadequado (Rigos et al, 1999).

O tratamento com FFC não ocasionou alteração no tecido renal, assim como observado por Inglis et al. (1991) em *S. salar* para tratar infecção causada por *A. salmonicida*. Porém ocorreu diminuição do tecido hematopoiético/linfopoiético de rins de *I. punctatus* e de *S. salar*, após a administração de  $10 \text{ mgFFC}\cdot\text{kg}^{-1}$  por 20 dias (Gaikowski et al., 2003; Schering-Plough, 2009).

## 6. CONCLUSÃO

A CL<sub>50</sub>;48h estimada de OTC para o pacu é de 7,6 mgL<sup>-1</sup> e de FFC > 1.000 mgL<sup>-1</sup>. A OTC reduz a concentração do oxigênio dissolvido e de forma inversamente proporcional à concentração diluída na água. A OTC é de baixo risco de intoxicação ambiental para o pacu e o FFC é sem risco de intoxicação ambiental para o pacu e não altera as variáveis de qualidade da água.

A OTC, em concentrações de até 170,0 mgkg<sup>-1</sup> de ração, não é eficaz para o controle de *A. hydrophila* em pacu e o FFC é eficaz na concentração de 10,0 mgkg<sup>-1</sup> de ração para o controle e tratamento de infecção por *A. hydrophila* em pacu.

A OTC e o FFC administrados na ração não alteram as variáveis de qualidade de água.

A *A. hydrophila* causa lesão na epiderme, derme e na camada muscular, edema subepitelial, aneurisma, fusão lamelar, hiperplasia e hipertrofia de células mucosas, cloreto e de revestimento das brânquias de pacu.

A *A. hydrophila* e a administração de OTC e FFC causam hiperplasia dos hepatócitos, porém não causam alteração no rim de pacu.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. São Paulo, 2004, 19 p.
- AKIYOSHI, H., INOUE, A. Comparative histological study of teleost livers in relation of phylogeny. **Zool. Sci.**, v. 21, 841-850, 2004.
- ALEXANDRINO, A.C.; OKUMURA, M.P.M.; BALDASSI, L.; TABATA, Y.A.; PAULI, A.O.S.; ARAUJO, A.P.; ROSA, M.B. Ocorrência de infecção por *Edwardsiella tarda* em truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intensivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 25, p. 121-123, 1998/1999.
- ALL-BANAW, A.; KENNGOTT, R.; AL-HASSAN, J. M.; MEHANA, N.; SINOWATZ, F. Histochemical Analysis of Glycoconjugates in the Skin of a Catfish (*Arius tenuispinis*, Day). **Anat. Histol. Embryol.**, v. 39, p. 42–50, 2010.
- ANDRADE, L. S.; ANDRADE, R. L. B.; BECKER, A. G.; BALDISSEROTO, B. Survival and behavior of silver catfish, *Rhamdia quelen*, submitted to antibiotics and sodium chloride treatments. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 1004-1007, 2006.
- ANGKA, S.L.; LAM, T.J.; SIN, Y.M. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v. 130, p. 103-112, 1995.
- AOKI, T. Mobile aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. (Ed.) **Fish diseases and disorders**. Oxon: CABI Publ., v. 3: Viral, bacterial and fungal infections, cap.11, p. 427-453, 1999.
- ARAUJO, R.M., ARRIBAS, R.M., LUCENA, F. et al. Relation between *Aeromonas* and faecal coliforms in fresh waters. **J. Appl. Bacteriol.**, v.67, p.213-217, 1989.
- AUSTIN, B; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish**. Ellis Horwood Limited, p. 171-173, 1987.
- BARRAGY, T.B. In: Veterinary drug therapy (Barragy, T.B. ed.), Lea e febinger, Malvern, USA., p. 264-275, 1994.
- BARREIRO, E. J.; SILVA, J. F. M.; FRAGA, C. A. M. Noções básicas de metabolismo de fármacos. **Química Nova**, v. 19, n. 6, p. 641-650, 1996.
- BASTOS, C. V. L. F.; SALLES, J. B.; VALENTE, R. H.; LEON, I. R.; PERALES, J.; DANTAS, R. F.; ALBANO, R. M.; BASTOS, F. F.; BASTOS, J. C. Cytosolic glutathione

peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. **Biochimie**, v. 89, p. 1332-1342; 2007.

BÉKÉSI, L. Evaluation of data on ichthyopatological analysis in the Brazilian Northeast. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 6, p. 100-403, 1992.

BEHMER, A.O. TOLOSA, E.M.C. FERITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.**, p. 239, 1976.

BEREITER-HAHN, J. Epidermal cell migration and wound repair. In: **Biology of the Integument**, v. 2 -Vertebrates. Heidelberg: Springer, p. 443-471, 1986

BJÖRKLUND, H.V.; BYLUND, G. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Xenobiotica**, v. 21, p. 1511–1520, 1991.

BOXALL, A. B. A.; FOGG, L.; BLACKWELL, P. A.; KAY, P.; PEMBERTON, E. Review of Veterinary Medicines in the Environment. **Environment Agency R&D Technical Report P6-002/TR**, 2002.

BRUUN, M.S., SCHMIDT, A.S., MADSEN, L., DALSGAARD, I. Antimicrobial resistance patterns in danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*, **Aquaculture**, v. 187, p. 201–212, 2000.

BULLOCK, G.L., HSU, T.C., SHOTTS, E. B. JR. Columnaris disease of fishes. U.S. **Fish and Wildlife Service Fish Disease Leaflet**, v. 72, p. 9, 1986.

CAHILL, M.M. Virulence factors in motile *Aeromonas*: A review. **Journal Applied Bacterial**, v. 69, p. 1-16, 1990.

CARAVALHAL, M.L.; ALTERTHUM, F. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3td Ed., São Paulo, Atheneu, cap. 2, p. 9-23, 1999.

CARNAHAN, A.M.; BEHRAM, S.; JOSEPH, S.W. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical aeromonas species. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.29, p. 2843-2849,1991.

CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S.M.F. **Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu *Colossoma mitrei* (BERG, 1895)**, Jaboticabal: FCAV/UNESP, p. 26, 1985.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Fundação de Estudos e Pesquisa em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Jaboticabal, p. 157-70, 1992.

- CECCARELLI, P.S.; FIGUEIRA, L.B.; FERRAZ DE LIMA, C.L.B. ; OLIVEIRA, C.A. Observações sobre a ocorrência de parasitos no CEPTA entre 1983 e 1990. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 3, p. 43-54, 1990.
- CHEN, C. Y.; GETCHELL, R. G.; WOOSTER, G. A.; CRAIGMILL, A. L.; BOWSER, P. R. Oxytetracycline Residues in Four Species of Fish after 10-Day Oral Dosing in Feed. **Journal of Aquatic Animal Health**, 16:208–219, 2004.
- CONTRERAS-GUSMÁN, E.S. **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal, Editora Funep, 1994, 409p.
- CONAMA 357. 17 de março de 2005. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res\\_conama\\_357\\_05.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf). Acesso em 22 de outubro de 2009.
- CRUZ, C., MACHADO-NETO, J. G., MENEZES, M. L. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Pesticidas: Rev Ecotox Meio Amb**, v. 14, p. 93-102, 2004.
- CRUZ, C. Aspectos toxicológicos de paration metílico e de extrato aquoso de folhas secas de nim (*Azadirachta indica*) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e eficácia no controle de monogenea Dactylogyridae. **Tese de Doutorado**, Caunesp, p. 96, 2005.
- DARWISH, A. M. Laboratory efficacy of florfenicol against *Streptococcus iniae* infection in sunshine bass. **Journal Aquatic Animal Health**, v. 19, n. 1, 1-7, 2007.
- DEAN, H. M.; TOST, R.M. Fatal infection with *Aeromonas hydrophila* in a patient with acute myelogenous leukaemia. **Annals Internal Medicine**, v. 66, p. 1177-1179, 1967.
- DELÉPÉE, R.; POULIQUEN, H.; BRIS, H.L. The bryophyte *Fontinalis antipyretica* Hedw bioaccumulates oxytetracycline, flumequine and oxolinic acid in the freshwater environment. **Sci Total Environ**, v. 322, p. 243–253, 2004.
- DÍAZ-CRUZ, M.S. e BARCELÓ, D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. **Trac-Trends Analytical Chemistry**, v. 26, p. 637-646, 2007.
- DIXON, B. A.; ISSAVORAN, G. S. The activity of ceftiofur sodium for *Aeromonas* spp. isolated from ornamental fish. **J Wildlife Disease**, v. 28, n. 3, p. 453-456, 1992.

- EGUCHI, K.; NAGASE H.; OZAWA, M.; ENDOH, Y. S.; GOTO, K.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K.; YOSHIMURA, H.; Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. **Chemosphere**, v. 57, p. 1733–1738, 2004.
- ELEMA, M.O., HOFF, K.A., KRISTENSEN, H.G. Bioavailability of oxytetracycline from medicated feed to atlantic salmon (*Salmon salar*) in seawater. **Aquaculture**, v. 144, p. 7-14, 1996.
- FANTA, E. RIOS, F.S. ROMÃO, S. VIANNA, A.C.C. FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotox Environ Safety**, v. 54, p. 119-130, 2003.
- FAO, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Responsible use of antibiotics in aquaculture, 2005, 89 p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0282e/a0282e00.pdf>, Acesso dia 15 de setembro de 2009.
- FDA. 1998. Food and Drug Administration. “Chapter 11: Aquaculture Drugs.” In **Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide**. (Second Edition). FDA: Washington, D.C. pp. 115-132.
- FERREIRA, C.S.G.; NUNES, B.A.; HENRIQUES-ALMEIDA, J.M.M.; GUILHERMINO, L. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotox Environ Safety**, v. 67, p. 452–458, 2007.
- FIGUEIREDO, J.; PLUMB, J.A. Virulence of different isolates of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. **Aquaculture**, v. 11, p. 349-354, 1977.
- FIJAN, N.N.; KUNST, L., TOMASEC, I. O liceju zarazne boden bolesti sarana nekim antibioticima i furozolidonom. **Veterinary Archives**, v. 37, p. 34-45, 1976.
- FRAIRE, A.E. *Aeromonas hydrophila* infection. **J American Medicine Association**, v. 239, p. 192, 1978.
- FRERICHS, G.N.; MILLAR, S.D. **Manual of the isolation and identification of fish bacterial pathogens**. Stirling: Pisces Press, 1993, 60 p.
- FUKUI H., FUJIHARA Y., KANO T. In vitro and in vivo antibacterial activities of florfenicol, a new fluorinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens. **Fish Pathology**, v. 22, n. 4, p. 201–207, 1987.

- GAIKOWSKI, M. P., WOLF, J. C.; ENDRIS, R. G.; GINGERICH, W. H. Safety of Aquaflor (Florfenicol, 50% Type A Medicated Article), Administered in Feed to Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. **Toxicol Path**, v. 3, p. 689–697, 2003.
- GOLTHERMAN, H. L. CLYMO, R. S., OHNSTAD, M. A. M. *Methods Physical and chemical analysis of fresh water*. London: Blackwell, 1978. 213p.
- GRAHAM, R.; PALMER, D.; PRATT, B.C.; HART, C.A. In vitro activity of florfenicol. **Eur J Clin Microb Infection Disease**, v. 7, p. 691–694, 1988.
- GRIFFIN, P. J.; SNIEZSKO, S.F.; FRIDDLE, S.B. A more comprehensive description of *Bacterium salmonicida*. **Transaction American Fisheries Society**; v. 82, p. 129-138, 1953.
- GRIFFIN, B. R. Status of chemicals for use in warmwater fish production. **Aquaculture**. Mag., v. 18, n. 1, p. 76-78, 1992.
- GRIZZLE, J.M.; ROGERS, W.A. **Anatomy and Histology of the Channel Catfish**, Auburn, Alabama, ed Auburn University, 1985, 94p.
- GRONDEL, J.L.; NOUWS, J.F.M.; DE JONG, M.; SCHUTTE, A.R.; DRIESSENS, F. Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in carp, *Cyprinus carpio* L., following different routes of administration. **J Fishes Diseases**, v. 10, p. 153–163, 1987.
- HALLING-SØRENSEN, B., HOLTEN LUTZHØFT, H. C., ANDERSEN, H. R., INGERSLEV, F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimetropim and ciprofloxacin. **J Antimicrobial Chemotherapy Supplied**. S1, v. 46, p. 53-58, 2000.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, V. Trimed Sperman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. **Environ Sci Technol**, v. 7, p. 714-719, 1977.
- HAVELAAR, A. H.; DURING, M.; VERSTEEGH, J. F. M. Ampicillindextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. **J Applied Microbiology**, v. 62, p. 279- 287, 1987.
- HEKTOEN, H.; BERGE, J.A.; HORMAZABAL, V.; YNDESTAD, M. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. **Aquaculture**, v. 133, p. 175–184, 1995.
- HOLLIMAN, A. The veterinary approach to trout. In: BROWN, L. (Ed.). **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**. Oxford: Pergamon Press, 1993. cap.14, p.223-247.
- HOSHINA, T. Studies on red-fin disease of eel. **Special Research Report of Tokyo Universities Fisheries**, Tokyo, 1962, n. 6, 105 p.

HOWARD, S. P.; BUCKLEY, J. T. Activation of the hole-forming toxin-related factor in cultures of *Aeromonas* species by enzyme-linked immunosorbent assay. **Infection and Immunity**, v. 50, p. 322-323, 1985.

HOLTEN-LÜTZHØFT, H. C.; HALLING-SØRENSEN, B.; JØBRGENSEN, S. E. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. **Environ Contam Toxicol**, v. 36, p. 1-6, 1999.

HORSBERG, T. E., HOFF, K. E., NORDMO, R., Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in Atlantic salmon. **J Aquatic Animal Health**, v. 8, p. 292-301, 1996.

HUDSON, J. A. e LACY, K. M. Incidence of motile aeromonads in New Zealand retail foods. **J Food Protection**, Iowa, v. 54, p. 696-699, 1991.

HUGHES, J. S. Acute toxicity of thirty chemicals to stripes bass (*Morone saxatilis*). **Presented at the Western Association of State Game and Fish Commissioners in Salt Lake City**, Utah, 1973.

INGLIS, V.; RICHARDS, R. H.; VARMA, K. J.; SUTHERLAND, I. H.; BROKKEN E. S. Florfenicol in Atlantic salmon, *Salmo salar L*, parr: tolerance and assessment of efficacy against furunculosis. **J Fish Disease**, v. 14, p. 343-351, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Estatística da pesca 2003**, Brasil, grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, p. 89, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Estatística da pesca 2006**. Brasil, grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, p. 180, 2006.

ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, N.; PASCARELLA, L.; PARRELLA, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. **Science of the Total Environment**, v. 346, p. 87-98, 2005.

IGER, Y. e ABRAHAM, M. The process of skin healing in experimentally wounded carp. **Journal Fisheries Biology**, v. 36, p. 421-437, 1990.

IWASHITA, M. K. P. Influência da vitamina E na cinética do processo cicatricial induzido em tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*. Artigo apresentado ao Programa de Pós graduação em

Aquicultura do Caunesp como requisito para obtenção do título de **Mestre em Aquicultura**. 28p., 2008.

JOSEPH, S. W.; DAILY, O. P.; HUNTER, W. S.; SEIDLER, R. J.; ALLEN, D. A.; COLWELL, R.R. *Aeromonas* primary wound infection of a diver in polluted waters. **Journal Clinical Microbiology**, v. 10, p. 46-49, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U., MONTES, G. S., SANCHEZ, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, v. 74, p. 153-156, 1982.

JUNQUEIRA, L.C.U., JOAZEIRO, P.P., MONTES, G.S., MENEZES, N. e PEREIRA FILHO, M. É possível o aproveitamento industrial da pele dos peixes de couro? **Tecnicouro**, v. 5, n. 5, 4-6, 1983.

KANAI, K.; WAKABAYASHI, H. Purification and some properties of protease from *Aeromonas hydrophila*. **Biology Japanese Scopus Science Fishes**, v. 50, n. 8, p. 1,367-137, 1984.

KETOVER, B.P.; YOUNG, L.S.; ARMSTRONG, D. Septicemia due to *Aeromonas hydrophila*: clinical and immunological aspects. **Journal Infectation Disease**, v. 127, p. 284-290, 1973.

KIM, Y.; CHOI, K.; JUNG, J.; PARK, S.; KIM, P.; PARK, J. Aquatic toxicity of cetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. **Environment International**, v. 33, p. 370–375, 2007.

KINKELIN, P. MICHEL, C., GHITTINO, P. **Tratado de las enfermedades de los peces**. Ed. Acribia, Zaragoza, 1992, 353 p.

KNOCHEL S. Growth characteristics of motile *Aeromonas* spp. isolated from different environments. **International Journal Food Microbiology**, v. 10, p. 235-244, 1990.

KOBAYASHI, T.; IMAI, M.; KAWAGUCHI, Y. A gram-negative bacillus infection causing gill lesions in culture rockfish *Sebastes schlegeli*. **Fish pathology**, v. 40, n. 3, p. 143-145, 2005.

KOSOFF, R. E.; CHEN, C.Y.; WOOSTER, G. A.;GETCHELL, A. G.; BOWSER, P.R.; CLIFFORD, A.; CRAIG, J. L.; LIM, P.; WETZLICH, S. E.; CRAIGMILL, A. L. TELL, L. A. Florfenicol Residues in Three Species of Fish after 10-Day Oral Dosing in Feed. **Journal of Aquatic Animal Health**, 21:8–13, 2009.

LEE, T.H., HWANG, P.P., LIN, H.C. Morphological changes of integumental chloride cells to ambient cadmium during the earling development of teleost, *Oreochromis niloticus*. **Environmental Biology of Fish**, v.45, p. 95-102, 1996.

LIN, C. K. Shrimp culture in Taiwan: what went wrong? **Aquaculture**, v. 20, p. 19–20, 1989.

LUTZHOFT, H. C. H.; HALLING-SORENSEN, B.; JORGENSEN, S. E. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 36, p. 1–6, 1999.

LUNDEN, T., MIETTINEN, S., LOENNSTROEM, L. G., LILIUS, E. M., BYLUND, G. Influence of oxytetracycline and oxolinic acid on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 8, p. 217-230, 1998.

LUVIZOTTO, M. F. Efeito de diferentes salinidades sobre as células de cloreto e as células secretoras do epitélio branquial do peixe antártico *Nototheniops nudifons* (Lonnberg, 1905). Curitiba, 1994. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Canadian Journal Fisheries Aquatic Science** v.42, p. 630-648, 1985.

VAN der MAREL, M.; CASPARI, N.; NEUHAUS, H.; MEYER, W.; ENSS, M. L.; STEINHAGEN, D. Changes in skin mucus of common carp, *Cyprinus carpio* L., after exposure to water with a high bacterial load. **J fish Diseases**, v. 33, p. 431-439, 2010.

MARTINSEN, B.; HORSBERG, T. E.; VARMA, K. J.; SAMS, R. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in sea water at 118C., **Aquaculture**, v. 112, p. 1-11, 1993.

MARTTY, H. **Los peces y sus enfermedades**. Buenos Aires: Albatros, v. 2, 1986.

MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1976, 312p.

MCGINNIS, A.; GAUNT, P.; SANTUCCI, T.; SIMMONS, R.; ENDRIS, R. In vitro evaluation of the susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*, etiological agent of enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to florfenicol. **Journal Veterinary Diagnostics Investigation**, v. 15, p. 576–579, 2003.

- MICROMEDEX, INC. 2000. **Drugs for Animal Use: Tetracyclines Veterinary-Systemic. United States Pharmacopia Convention Inc.**, Disponível em: <http://www.usp.org/veterinary/monographs/tetracyclines.pdf> . Acesso em 01 out 2009.
- MIRANDA, C. D.; ZEMELMEN, R. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. **Aquaculture**, v. 212, p. 31–47, 2002.
- MITTAL, A. K., MUNSHI, J. S. D. On the regeneration and repair of superficial wound in the skin of *Rita rita* (Ham.) (Bagridae, Pisces). **Acta Anatomy**, v. 88, p. 424-442, 1974.
- MIYAZAKI, T.; JO, Y. A histopathological study of motile *Aeromonas* disease in ayu. **Fish Pathology**, v. 20, p. 55-59, 1985.
- MORAES, J. R. E.; FREITAS, J. B.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. A SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM VITAMINA C ACELERA A EVOLUÇÃO DO PROCESSO CICATRICIAL EM *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 29, n. 1, 57 - 67, 2003.
- NAMDARI, R.; ABEDINI, S.; LAW, F. C. P. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in seawater chinook and salmon following medicated-fees treatment. **Aquaculture.**, v. 144, p. 27-38, 1996.
- NEVES, M. S., NUNES, M. P., RICCIARDI, I. D. Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Food Protection**, v.53, p.78-80, 1990.
- NOGA, E. J. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Editora Mosby, 1995, 663p.
- NORD, C. E.; SJOBERG, L.; WADSTROM, T.; WRETLIND, B. Characterization of tree *Aeromonas* and nine *Pseudomonas* species by extracellular enzymes and haemolysis. **Medicine Microbiology Immunology**, v. 161, p. 79-87, 1975.
- NORDMO, R.; VARMA, K. J.; SUTHERLAND, I. H.; BROKKEN, E. S. Florfenicol in Atlantic salmon, *Salmon salar* L.: field evaluation of efficacy against furunculosis in Norway. **J Fish Disease**, v. 17, p. 239–244, 2006.
- NOUWS, J. F. M., GRONDEL, J. L., BOON, J. H., VAN GINNEKEN, V. J. T. Pharmacokinetics of antimicrobials in some fresh water fish species. In: Michel, C.M., Aldeman, D.J. Eds, **Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality**. Office of International Epizootiology, Paris, p. 437–447, 1992.

- NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species, *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmi chuii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 413–419, 2005.
- PARK, S.; CHOI, K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems, **Ecotoxicology**, v. 17, p. 526–538, 2008.
- PELLINEN, T., BYLIND, G., VIRTA, M., NIEMI, KARP, M. J. **Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 4812-4815, 2002.
- PENDERS, J.; STOBBERINGH, E.E. Antibiotic resistance of motile aeromonads in indoor catfish and eel farms in the southern part of Netherlands. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 261-265, 2008.
- PEREIRA JÚNIOR, D. J.; FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; LEAL, C. A. G. Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados DE *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes, **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1190-1195, 2006.
- PHROMSUTHIRAK, P. Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. **J Fish Biology**, v. 11, p. 193-206, 1977.
- PLUMB, J. A. **Health maintenance of cultured fishes**. Principal microbial diseases. USA : CRC, 1994. 254p.
- PLUMB, J. A., VINITNANHARAT, S. Dose titration of sarafloxacin (A-56620) against *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish. **J Aquatic Animal Health**, v. 2, n. 3, p. 194-197, 1999.
- POPOFF, M. Genus III. *Aeromonas* Kluyer and Van Niel. In: DRIEG, N. R. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians and Wilkins, v. 1, p. 545-584, 1984.
- POST, G. **Fish health**. T. F. H. Publications, p. 37-41, 1987.
- QUADRI, S. M. H.; GORDON, J. P.; WENDE, R. D.; WILLIAMS, R. P. Meningitis due to *Aeromonas hydrophila*. **J Clin Microb**, v. 3, p. 102-104, 1976.
- QUILHAC, A., SIRE, J. Y. Restoration of the subepidermal tissues and scale regeneration after wounding a cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*. **J Exper Zool**, v. 281, p. 305–327, 1998.
- RACH, J. J.; JOHNSON, A.; RUDACILLE, J. B.; SCHLEIS, S. M. Efficacy of Oxytetracycline Hydrochloride Bath Immersion to Control External Columnaris disease on Walleye and Channel Catfish Fingerlings. **North American Journal of Aquaculture**, v. 70, p. 459–465, 2008.

- RALPHS, J.R.; BENJAMIN, M. Chondroitin and keratin sulphate in the epidermal club cells of teleosts. **J Fish Biology**, London, v. 40, p. 473-475, 1992.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology**, p. 665, 1985.
- RANGDALE, R. E.; RICHARDS, R. H.; ALDERMAN, D. J. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial compounds against *Flavobacterium psychrophilum* the causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS). **Aquaculture**, v. 158, p. 193–201, 1997.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; CAMPOS, B. E. S.; EIRAS, A. C. Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus*, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 329-339, 1997.
- REED, L. A.; SIEWICKI, T. C.; SHAH, J. C. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. **Aquaculture**, v. 232, p. 11–28, 2004.
- RIGOS, G., ALEXIS, M. AND NENGAS, I., Leaching, palatability and digestibility of oxolinic acid and oxytetracycline in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture Research**, v.30, p. 1–7, 1999.
- RIGOS, G.; ALEXIS, M.; ANDRIOPOULOU, A.; NENGAS, I. Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, at two water temperatures. **Aquaculture**, v. 210, p. 59–67, 2002.
- RIGOS, G., TROISI, G. M. Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: A synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications. **Reviews and Fish Biology and Fisheries**, v. 15, p. 53, 2005.
- RIGOS, G., NENGAS, I., ALEXIS, M. E. Oxytetracycline (OTC) uptake following bath treatment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 261, p. 1151-1155, 2006.
- ROBERTS, R. J.; BULLOCK, A. M. **The skin surface ecosystem of teleost fishes**. Proc. Royal Soc. Edimb. v. 79, p. 87-91,1980.
- ROBERTS, R. J. **Patologia de los peces**, Madri, Ediciones Mundi-Prensa, 1981, 366p.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Pathologic basis of Disease. Editora Elsevier, 2004, 338p.
- SAAD, S. M. I.; IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M. P. Motile *Aeromonas* spp. in retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-27, 1995.

- SAKAI, D. K. Loss of virulence in a protease-deficiency mutant of *Aeromonas salmonicida*. **Infection Immunology**, v. 48, p. 146-152, 1985a.
- SAKAI, D. K. Significance of extracellular protease for growth of a heterotrophic bacterium *Aeromonas salmonicida*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1031-1037, 1985b.
- SAMUELSEN, O.; BERGH, Ø. Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua*), **Aquaculture**, v. 235, p. 27–35, 2004.
- SAMUELSON, O. B. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities and the persistence of oxytetracycline in sediment from a fish farm. **Aquaculture**, v. 83, p. 7-16, 1989.
- SANCHEZ-MARTINEZ, J.G.; PE REZ-CASTAN EDA, R.; RA BAGO-CASTRO, J.R.; AGUIRRE-GUZMA N, G.; VA ZQUEZ-SAUCEDA, M.L. A Preliminary Study on the Effects on Growth, Condition, and Feeding Indexes in Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, after the Prophylactic Use of Potassium Permanganate and Oxytetracycline. **J Aquaculture Society.**, v. 39, n. 5, p. 664-670, 2008.
- SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH. Aquaflo. Florfenicol. Technical Monograph for catfish health professionals, 2009, 36 p.
- SCOTT, P. Therapy in aquaculture. In: Brown, L. (ed.), **Aquaculture for Veterinarians**. Pergamon Pres, Oxford, p. 131-153, 1993.
- SNIESZKO, S. F.; FRIDDLE, S. B.; GRIFFIN, P. J. Successful Treatment of Ulcer Disease in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) with Terramycin. **Science**, v. 113, p. 2, 1951.
- SELJESTOKKEN, B.; BERGH, O.; MELINGEN, G. O.; RUDRA, H.; HETLILIDOLSEN, R.; SAMUELSEN, O. B. Treating experimentally induced vibriosis (*Listonella anguillarum*) in cod, *Gadus morhua* L., with florfenicol. **J Fish Diseases**, v. 29, p. 737–742, 2006.
- SEREZLI, R., CAGIRGAN, H., OKUMUS, I., AKHAN, S., BALTA, F. The effect of oxytetracycline on nonspecific immune response in sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). **Turkey Journal Veterinary Animal Science**, v. 29 p. 31-35, 2005.
- SEVERI, W.; RANTIN, F. T.; FERNANDES, M. N. Structural and morphology features of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) gills. **Revista Brasileira de Biologia** v. 60, n. 3, p. 493- 501, 2000.

- SILVA, A. J. Aspectos da alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (Berg, 1895) (Pisces, Characidae) no pantanal de Mato Grosso. **Dissertação** (Mestrado-Zoologia), UFRJ, Rio de Janeiro, 1985, p.92.
- SKIMORE, J. F.; TOVELL, P. W. A. Toxic effects of zinc sulfate on the gills of rainbow trout. **Water Research**, v. 6, p. 217-230, 1972.
- SOLER, F.; REJA, A.; GARCÍA-RUBIO, L.; MÍGUEZ, M. D. P.; RONCERO, V. Anatomopathological effect of oxytetracycline in tench (*Tinca tinca*). **Toxicology Lett**, v. 88, p. 104, 1996.
- SOUZA, J. A.; EIRAS, J. C.; ALEXANDRINO, A. C.; ISHIKAWA, C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; EIRAS, A. C. Preliminary bacteriological evaluation of semi-intensively farmed fish (*Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Colossoma macropomus*) in São Paulo State, Brazil. **Revista Unimar**, v. 18, n. 2, p. 299-306, 1996.
- SOUZA, M. L. R.; GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O.; SANT'ANA FARIA, R. H.; WAGNER, P. M.; POVH, J. A.; FERREIRA, I. C. Histologia da pele do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e testes de resistência do couro, Maringá, **Acta Scientiarum**, v. 25, n. 1, p. 37-44, 2003.
- SVOBODOVÁ, Z.; SUDOVÁ, E.; NEPEJCHALOVÁ, L.; CERVINKA, S.; VYKUSOVÁ, B.; MODRÁ, H.; KOLÁROVÁ, J. Effects of Oxytetracycline Containing Feed on Pond Ecosystem and Health of Carp (*Cyprinus carpio* L.), **Acta Veterinaria Brno**, v. 75, p. 571–577, 2006.
- STRAUS, D. L. Comparison of the acute toxicity of potassium permanganate to hybrid striped bass in well water and diluted well water. **J World Aquaculture Society**, v. 35, p. 55–60, 2004.
- STOSKOPF, M. K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, p. 269-277, 1993.
- THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v. 166, p. 145-167, 2003.
- THOMAS-JINU, D. C. S., GOODWIN, A. E. Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds. **J Fish Disease**, v. 27, p. 23-28, 2004.
- THYSSEN, A.; OLLEVIER, F. In vitro antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 different antimicrobial agents. **Aquaculture**, v. 200, p. 259–269, 2001.

- UENO, R.; KINOSHITA, A.; WAKABAYASHI, J. Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in eel and its fate in a closed aquatic environment. **Aquaculture**, v. 235, p. 53–63, 2004.
- U.S. Government Printing Office (US GPO)** 1986. Oxytetracycline. Title 21, parts 586– 589. *In* Code of Federal regulations. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- UNO, K. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in healthy and vibriosis-infected ayu (*Plecoglossus altivelis*), **Aquaculture**, v. 143, p. 33–42, 1996.
- USEPA. **Guidelines for Ecological Risk Assessment**. States Environmental Protection Agency, Washington D.C., 171p, 1998.
- USEPA. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms**. Fourth Edition. Washington, D. C. (EPA-821-R-02-13), 335 p., 2002.
- USP, 2000, **Tetracyclines Monography**. Disponível em: <<http://www.usp.org/pdf/EN/veterinary/tetracyclines.pdf>> Acesso dia 27 de outubro de 2009.
- USOFR (U.S. Office of the Federal Register). 2007. **Code of Federal Regulations**, Title 21, Parts 556.283, 558.4, 558.261. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- D.C.VALENTI, W. C. **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. CNPq / Ministério da Ciência e tecnologia. Brasília-DF, 2000, 399p.
- VAN DER HEIJDEN, M. H. T.; VAN MUISWINKEL, W. B.; GRONDEL, J. L.; BOON, J. H. Immunomodulating effects of antibiotics. In: **Chemotherapy in Aquaculture: from Tudory to reality symposium**. Paris, p. 219-239, 1991.
- VAZ, M. M. et al., (Org.). **Guia Ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: Cemig/Cetec, 2000. 144p.
- VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Livraria Varela, p. 380, 2003.
- VUE, C.; SCHMIDT, L. J.; STEHLY, G. R.; GINGERICH, W. H. Liquid chromatographic determination of florfenicol in the plasma of multiple species of fish. **J Chromat**, B 780, p. 111–117, 2002.
- WANG, Q.; LI, J. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in perch *Lateolabras japonicus* and black seabream (*Sparus macrocephalus*) following oral administration. **Aquaculture**, v. 237, p. 31-40, 2004.

WAKABAIASHI, H.; KANAI, K.; HSU, T. C.; EGUSA, S. Pathogenic activities of *Aeromonas hydrophila biovar hydrophila* (Chester) to fishes., Popoff and Veron, 1976. **Fish Pathology**, v. 15, p. 319-325, 1981.

WEBB, S. F. A data-based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals. I. Collation of available ecotoxicity data. In: Kümmerer K (ed) Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks. **Springer**, Heidelberg, p. 175–201, 2001.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SØRENSEN, B.; KUSK, K. O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 40, p. 723-730, 2000.

YASUNAGA, N.; YASUMOTO, S. Therapeutic effect of florfenicol on experimentally induced pseudotuberculosis in yellow tail. **Fish Pathology**, p. 23, 1–5, 1988.

YUNIS, A. A. Chloramphenicol: relation of structure to activity and toxicity. **Annuals Reviews Pharmacology Toxicology**, v. 28, p. 83-100, 1988.

ZAGATTO, P. A., & E. BERTOLETTI, 2008, **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**, Editora Rima, São Carlos, 478 p.