



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAUNESP - Centro de Aquicultura da Unesp



Hematologia e macrófagos policariontes em *Collossoma macropomum*, mantidos em duas densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina

Adriano Gonçalves
Biólogo

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

Hematologia e macrófagos policariontes em *Colossoma macropomum*, mantidos em duas densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da UNESP (CAUNESP), como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Aquicultura, área de concentração em Aquicultura.

Adriano Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva

Co-orientador: Prof. Adalberto Luiz Val

Jaboticabal – SP
Janeiro/2009

G635h Gonçalves, Adriano
Hematologia e macrófagos policariontes em *Colossoma macropomum*, mantidos em duas densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina – –
Jaboticabal, 2009
viii, 65 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2009
Orientador: Maria José Tavares Ranzani de Paiva
Co-orientador: Adalberto Luiz Val
Banca examinadora: Flávio Ruas de Moraes, Paulo Sérgio Ceccarelli, Eduardo Makoto Onaka, Anna Eliza Bacarin
Bibliografia

1. Nutrição. 2. Tambaqui. 3. Hematologia. 4. Macrófago I. Título.
II. Jaboticabal- Centro de Aquicultura .

CDU 639.3.043

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DEDICATÓRIA

Dedico
este pequeno
trabalho a meu filho
Rafael Verreschi Gonçalves.

Pequeno !

Porque pequeno ?

Tudo é pequeno,

Próximo a algo grandioso.

Ao lado de tudo que é imenso,

Grande torna-se pequeno.

*Assim, grande é pequeno comparado a um bem muito
querido.*

AGRADECIMENTOS

- A minha orientadora - Profa Dra Maria José Tavares Ranzani de Paiva - como diz o amigo Paraca a “**MÃESÉ**”, o nome já diz tudo...
- Agradeço ao Pesquisador Marcos Guilherme Rigolino da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Campos do Jordão, pelo apoio intelectual e criativo, fundamental para o desenvolvimento do projeto.
- Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Val pelo aceite como co-orientador e a Profa. Dra. Vera Val, pelo suporte necessário para o desenvolvimento do trabalho no laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, LEEM – INPA.
- A Veralice, pessoa muito dedicada e de grande ajuda em todos os momentos.
- A Pesquisadora Nazaré de Paula, responsável pelo laboratório, obrigado pela grande ajuda que me forneceu.
- Ao Pesquisador Dr. Júlio Vicente Lombardi do Instituto de Pesca de São Paulo, sempre disposto a ajudar, mesmo nos momentos difíceis.
- A Pesquisadora. Dra. Neuza do Instituto de Pesca de São Paulo pela ajuda.
- Aos estagiários Ramon e Karen pelo apoio no processamento dos materiais, pessoas que me ajudaram muito na coleta de dados.
- A todos os companheiros de trabalho e estagiários do LEEM.
- Ao INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- Ao CAUNESP – Centro de Aquicultura da UNESP.
- Ao CNPq , por conceder a bolsa de estudo.
- A minha esposa Denise que sempre me ajudou em todos os momentos e a meu filho Rafael, que nasceu na época do desenvolvimento do trabalho, que nos traz muita alegria e satisfação a cada dia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 - Ração.....	16
4.2 – Ingredientes biológicos utilizados nas dietas.....	17
4.3 - Acondicionamento dos peixes.....	18
4.4 – Aclimação.....	18
4.5 – Início do experimento com as dietas.....	18
4.6 – Manejo das caixas.....	19
4.7 – Bioensaio – Implantação de lamínula.....	20
4.7.1 – Monitoramento da qualidade da água.....	22
4.7.2 Implante de lamínula.....	22
4.7.3 - Coleta das lamínulas	24
4.7.4 – Contagem de células.....	24
4.7.5 – Análises hematológicas.....	25
4.7.6 – Análises bioquímicas de sangue.....	25
4.7.7 - Dados biológicos.....	25
4.7.8 – Delineamento experimental e Análise Estatística.....	26
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÃO.....	53
7. REFERÊNCIAS.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Composição aproximada da ração comercial utilizado no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>	16
Tabela 2 – Princípio ativo dos ingredientes adicionados na ração de tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>	17
Tabela 3 - Tratamentos, concentração por ingredientes adicionados por kg de ração, veículo (óleo de soja) e unidades formadoras de colônia (UFC/g) utilizados no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>	17
Tabela 4 –. Médias das variáveis físicas e químicas da água utilizada no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> , alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.....	25
Tabela 5 –Desempenho zootécnico – peso médio inicial (PMI) e final (PMF) ganho de peso médio (GPM), comprimento médio inicial (CMI) e comprimento médio final (CMF), de juvenis de tambaqui alimentados durante 90 dias com dietas contendo probiótico e espirulina	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Caixas de água de 500 L utilizadas no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> , alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina	19
Figura 2 - Visualização do esquema de filtragem biológica utilizada no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> , alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina.....	20
Figura 3 – Caixas plásticas de 50 L utilizadas no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> , com diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina.....	21
Figura 4 – Implante da lamínula de vidro no tecido subcutâneo da região latero-dorsal em experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> , em diferentes densidades de estocagem, alimentado com dietas contendo probiótico e espirulina	23
Figura 5 – Sutura no local do implante da lamínula de vidro em experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> , com diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina ...	23
Figura 6 – Coleta de sangue por punção caudal em experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> , em diferentes densidades de estocagem, alimentado com dietas contendo probiótico e espirulina.....	25
Figura 7 – Biometria dos tambaquis <i>Colossoma macropomum</i> utilizados no experimento alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina.....	26
Figura 8 – Variação dos valores médios dos parâmetros hematológicos utilizados no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> com densidade de estocagem 5kg/m ³ , alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Hb = taxa de hemoglobina; Ht = hematócrito; Er = número de células.....	30

- Figura 9** – Variação dos valores médios dos parâmetros hematológicos utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 20kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Hb = taxa de hemoglobina; Ht = hematócrito; Er = número de células..... 31
- Figura 10-** Variação dos índices hematimétricos utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 5kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média..... 33
- Figura 11-**Variação dos índices hematimétricos utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 20kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média..... 34
- Figura 12a**–Valores médios do número de leucócitos totais e absolutos dos diferentes leucócitos, em sangue periférico, de tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 5kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Lc = número de leucócitos totais; Lf = número absoluto de linfócitos; Nt = número absoluto de neutrófilos; Mn = número absoluto de monócitos..... 37
- Figura 12b**– Valores médios do número de leucócitos totais e absolutos dos diferentes leucócitos, em sangue periférico, de tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 5kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Eos = número absoluto de eosinófilos; CGE = número absoluto de células granulocíticas especiais; Bs = número absoluto de basófilos 38

- Figura 13a**– Valores médios do número de leucócitos totais e absolutos dos diferentes leucócitos, em sangue periférico, de tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 5kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Lc = número de leucócitos totais; Lf = número absoluto de linfócitos; Nt = número absoluto de neutrófilos; Mn = número absoluto de monócitos..... 39
- Figura 13b**– Valores médios do número de leucócitos totais e absolutos dos diferentes leucócitos, em sangue periférico, de tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 5kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Eos = número absoluto de eosinófilos; CGE = número absoluto de células granulocíticas especiais; Bs = número absoluto de basófilos 40
- Figura 14**– Valores médios da contagem total de trombócitos, em sangue periférico, utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina..... 42
- Figura 15**– Valores médios de glicose utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina..... 44
- Figura 16** – Valores médios do número de macrófagos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina..... 46
- Figura 17** –Valores médios do número de células com dois núcleos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina..... 47

Figura 18 – Valores médios do número de células com três a cinco núcleos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.....	48
Figura 19 – Valores médios do número de células com seis a dez núcleos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.....	49
Figura 20 – Valores médios do número de células com onze a vinte núcleos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.....	50
Figura 21 – Valores médios do número de células com mais de vinte núcleos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.....	50
Figura 22 – Valores médios do número de células de Langhans em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.....	51

RESUMO

Este trabalho avaliou o efeito de dietas contendo probiótico e espirulina sobre a formação de macrófagos, variáveis hematológicas e bioquímicas em tambaqui *Colossoma macropomum* jovens mantidos em duas densidades de estocagem. Previamente foi conduzido por três meses com três dietas alimentares - grupo controle, probiótico e espirulina; utilizando três caixas de água com capacidade de 500 L em sistema aberto de produção com renovação de água e filtragem biológica. Posteriormente, o experimento teve a duração de 12 dias, utilizando 36 caixas plásticas com capacidade de 50 L, com aeração e renovação de água constantes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um esquema fatorial 3 x 2 x 2 (dietas x densidade de estocagem x lamínulas), totalizando em 12 tratamentos, onde cada tratamento apresentava um grupo com peixes implantados lamínulas (I) e outro grupo com peixes sem implantes de lamínulas (S), apresentando três repetições cada, sendo: T1 – ração controle com densidade 5 kg/m³ com (I) e (S); T2 – 1g probiótico/kg ração com densidade 5 kg/m³ com (I) e (S); T3 – 5g espirulina/kg ração com densidade 5 kg/m³ com (I) e (S); T4 – ração controle com densidade 20 kg/m³ com (I) e (S); T5 – 1g probiótico/kg ração com densidade 20 kg/m³ com (I) e (S); T6 – 5g espirulina/kg ração com densidade 20 kg/m³ com (I) e (S). Foram coletados dois indivíduos por tratamento, nos intervalos de 0, 3, 7, 10 e 12 dias experimentais para avaliação das variáveis hematológicas, bioquímicas e contagem dos núcleos das células gigantes. Os resultados mostraram que a suplementação da dieta de tambaqui com probiótico ou espirulina não causaram alterações nos valores hematológicos, bioquímicos e na formação de célula gigante. Contudo, ocorreu maior crescimento e sobrevivência nos peixes suplementados com dieta contendo probiótico, como também melhor recuperação quanto a lesão causada pelo implante de lamínulas.

ABSTRACT

The aim of this experiment was to evaluate the effect of diets containing probiotic and spirulina on small glass blades implanted, hematological and biochemistry parameters of tambaqui, *Colossoma macropomum*, juveniles, submitted to two different stocking densities. The pre-experimental period was led by three months with three alimentary diets – control group I, group containing probiotic in diet and group containing spirulina in diet; three boxes were used in a 500 L water capacity, in an open system of production with water renewal and biological filtering. After, the experiment had the duration of twelve days; thirty six plastic boxes were used in a 50 L, with aeration and constant water renewal. The experimental design was a factorial design - 3 x 2 x 2 (diets x stocking density x small glass blades), totaling twelve treatments, presented a group with small glass blades implanted fish (I) and another group with fish without implantations of small glass blades (S), with three repetitions each, being: T1 - ration controlled in density 5 kg/m³ with (I) and (S); T2 - ration containing 1g probiotic/kg in density 5 kg/m³ with (I) and (S); T3 - ration containing 5g spirulina/kg in density 5 kg/m³ with (I) and (S); T4 - ration controlled in density 20 kg/m³ with (I) and (S); T5 - ration containing 1g probiotic/kg in density 20 kg/m³ with (I) and (S); T6 – ration containing 5g spirulina/kg in density 20 kg/m³ with (I) and (S). Were collected two fish for treatment, in the intervals of 0, 3, 7, 10 and 12 experimental days for evaluation of the hematological and biochemistry parameters, and counting of giant cells nucleus. The results had shown that the diet supplemented with probiotic and spirulina had not caused alterations in the hematological and biochemistry parameters and in the formation of giant cells of tambaqui. However, it had bigger growth; survival and better muscular reconstitution process in fish fed with diets containing probiotic.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a Região Norte apresenta a maior produção pesqueira extrativista em peixes e crustáceos de água doce do Brasil, com o total de 225.911 toneladas ano. O Estado do Amazonas apresentou, em 2003, 28% do total da produção extrativista continental brasileira (MMA/ IBAMA/ CEPENE, 2003).

O tambaqui, *Colossoma macropomum* é um peixe bastante apreciado no país e principalmente pela população da região do Norte, o que justifica para os recentes estudos, demonstrando evidências que a sua abundância nos lagos esteja reduzida pelo excesso de exploração pesqueira. A quantidade dessa espécie desembarcada pela frota pesqueira de Manaus diminuiu em 75% nos últimos 10 anos (FREITAS *et al.*, 2007).

Essa crescente demanda por peixes com tamanho comercial tem contribuído para o impulso no desenvolvimento da piscicultura de algumas espécies nativas. Assim, o aprimoramento das técnicas de produção implica, na necessidade de aumentar os estudos que gerem informações sobre a reprodução e larvicultura, a nutrição e alimentação e o melhoramento dos sistemas de criação das espécies de interesse (ALVARADO, 2003).

Embora a criação de tambaqui tenha sido realizada com determinado sucesso em diversas pisciculturas do país, ainda existem lacunas no conhecimento sendo necessário desenvolver tecnologia para melhor controle dos fatores que possam interferir negativamente na produção como é o caso da ocorrência de doenças.

Os diferentes aditivos incorporados nas dietas alimentares de peixes, primam por melhorar a digestão e a nutrição por proporcionar o consumo de nutrientes essenciais e produzir substâncias que inibem o crescimento de patógenos oportunistas e estimulam o sistema imune. Tais aditivos, GATESOUBE (1999) têm como objetivo melhorar a saúde, são denominados probióticos, amplamente utilizados em dietas para a produção animal de diversas espécies (SILVA *et al.*, 2000; CORRÊA *et al.*, 2003; SOHAIL *et al.*, 2002; MICHELAN *et al.*, 2002; SANCHES *et al.*, 2006).

A microalga espirulina (*Spirulina maxima*), conhecida como alga azul, vem sendo estudada como aditivo para dietas na produção animal (GRINSTEAD *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 1998, TORRES-DURAÍN *et al.*, 1999) devido ao seu alto valor

nutricional - acima de 70% de proteína bruta e presença de micronutrientes: vitamina A, B12 e E (CONTRERAS *et al.*, 1979).

Vários pesquisadores têm desenvolvido estudos relacionados aos efeitos de fatores nutricionais sobre o desempenho produtivo e sobre os mecanismos de defesa orgânica em modelos de estudo de inflamação e infecção em peixes teleósteos de interesse zootécnico (MARTINS, 2000; PETRIC, 2000, PETRIC *et al.*, 2003; BELO, 2002, BRUM 2003; FUJIMOTO, 2004; GARCIA, 2005, BELO, 2006). Lesões inflamatórias crônicas granulomatosas de diversas origens podem apresentar em seu substrato as células multinucleadas cujo significado ainda não é bem compreendido. Essas células formam-se pela fusão das membranas de macrófagos e são dependentes do recrutamento de monócitos do sangue, que por sua vez, são requeridos nos compartimentos de reserva e na taxa de renovação do granuloma (RYAN e SPECTOR, 1970).

BELO, (2006) trabalhando com tilápias alimentadas com dietas suplementadas com vitamina E observou que 500 mg de vitamina E/kg de ração favoreceram significativamente o acúmulo celular, a formação de gigantócitos e de células de Langhans nas lâminas de vidro implantadas no tecido subcutâneo. Resultados demonstram que em juvenis de pacus *Piaractus mesopotamicus*, ocorre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo após três dias e que a suplementação da dieta com 100, 200 ou 500 mg de vitamina C/kg de ração induz aumento no número de macrófagos policariontes e número de núcleos/gigantócito formado e acelera a transformação de células do tipo corpo estranho em células de Langhans (PETRIC, 2003).

Embora o tambaqui seja uma espécie com potencial para a piscicultura, situações de confinamento e manejo inevitavelmente acabam gerando estresse, acarretando redução de consumo alimentar e diminuição da resistência imune, propiciando a ocorrência de doenças e muitas vezes mortalidade de lotes inteiros. Sendo assim, o uso de dietas contendo ingredientes promotores de saúde, pode ser uma medida preventiva com o intuito de auxiliar na manutenção do bem estar metabólico contribuindo assim para o desempenho animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desenvolvimento da Pesca e Aquicultura (Panorama Geral)

A pesca extrativa continental, com uma produção de 251.241 toneladas, representa 23,9% da produção total de pescado do Brasil e apresentou um crescimento de 3,2% em 2006, com um valor total estimado em cerca de R\$ 590 milhões. A região Norte produziu 147.931 t de pescado, com um valor total estimado em aproximadamente R\$ 290 milhões. Detém a maior produção da pesca extrativa continental do Brasil e registrou um crescimento de 9,1% quando comparado ao ano de 2005. Representa 58,9% da produção da pesca continental. (IBAMA, 2008).

Cerca de 8% do pescado capturado em água doce em todo o mundo provém da Amazônia sendo que 100 mil toneladas de pescado são produzidas anualmente na Amazônia brasileira e o valor da produção é de aproximadamente 100 milhões de dólares. Estudos sobre a composição do pescado no mercado de Manaus, e de outras cidades da Amazônia Central, mencionam que a pesca comercial explora cerca de 100 espécies, sendo que aproximadamente 90% da produção concentrada somente numa dezena de espécies, destacando-se o tambaqui – *Colossoma macropomum*, o jaraqui - *Semaprochilodus* sp., a matrinxã – *Brycon amazonicus*, o curimatã – *Prochilodus nigricans*, o pacu – dos gêneros *Mylossoma*, *Myleus* e *Mettynnis*, e o tucunaré *Cichla* sp. Em virtude dessa concentração de pesca em poucas espécies, existem evidências de que alguns estoques pesqueiros, especialmente o do tambaqui, estão sendo explorados acima da sua capacidade (SANTOS *et al.*, 2006).

Os Estados do Pará e Amazonas são os maiores produtores de pescado da região Norte. O Estado do Pará, com uma produção de 71.950 t, apresentou crescimento de 18,2% em 2006 quando comparado a 2005. As espécies de peixes que mais contribuíram para esse crescimento foram: curimatã, filhote, tucunaré e a piramutaba. O estado do Amazonas, com produção de 57.316 t, apresentou crescimento na produção de pescado de 3,4% em 2006. As espécies de peixes que mais contribuíram para esse crescimento foram: curimatã, pacu, tambaqui e matrinxã (IBAMA, 2008).

A aquicultura é o setor de produção de alimento que mais cresce no mundo. Nos últimos dez anos, a produção de pescado proveniente de aquicultura passou de aproximadamente 29 milhões de toneladas para 52 milhões de toneladas, o que corresponde atualmente a 35,96% do total da produção pesqueira mundial (pescado de captura e aquicultura, incluindo peixes, crustáceos e moluscos). Neste contexto, o Brasil ocupa o décimo sétimo lugar, com uma produção equivalente a 271.696 toneladas movimentando cerca de 470 milhões de dólares. Embora, a produção brasileira tenha acompanhado o crescimento da aquicultura na última década, sua posição no mercado internacional sofreu pequeno declínio, aumentando as importações e reduzindo as exportações entre os anos de 2004 e 2006 (FAO, 2006).

A aquicultura continental, com produção de 191.183,5 t/ano, representa 18,2% da produção de pescado total do Brasil, com valor estimado de R\$ 715 milhões em 2006, apresentando crescimento de 6,4% em relação a 2005. Na região Norte apresentou crescimento de 12,1%, na Nordeste de 2,1%, na Sudeste de 13,2%, na Sul de 6,1% e no Centro-Oeste de 1,3% em 2006. As principais espécies de peixes utilizadas na aquicultura dessas regiões são: tilápia e carpa (exóticas), tambacu (híbrido), tambaqui e curimatã (nativo). A região Norte, com produção de 22.100 t/ano representa 11,6% da produção da aquicultura continental, com valor total estimado de R\$ 85 milhões (IBAMA, 2008).

Segundo FRITSCH e DAROS (2003), o problema da sustentabilidade pesqueira no Brasil reside na sobrepesca, carência de informações, degradação de rios e lagos, frota de embarcações obsoletas e políticas governamentais adotadas que causaram o desequilíbrio do setor. Este mesmo autor salienta a existência de problemas estruturais da pesca, sociais dos pescadores e suas comunidades. Porém, o que mais chama a atenção é a constatação dos problemas estruturais da aquicultura, como: a inexistência de visão política dos diversos elos das cadeias produtivas e espécies criadas; conflito de interesses na gestão das águas; dispersão de esforço; carência sem como mão-de-obra capacitada, inexistência de modernas técnicas de manejo alimentar, procedimentos sanitários problemáticos e ambientais e de programa de investimento e financiamento para custeio da produção; insuficiência de alternativas alimentares necessárias para a engorda, e baixa efetividade dos serviços de assistência técnica e relativa desorganização dos produtores para a produção e comercialização de seus produtos.

No que se relaciona ao setor científico, às pesquisas relacionadas ao avanço da aquicultura sustentável no país exige muitos esforços nas áreas de nutrição, manejo e sanidade.

2.2 Tambaqui, *Colossoma macropomum*

O tambaqui, *Colossoma macropomum* da família Characidae, é endêmico das bacias do Amazonas e Orinoco, sendo muito comum em lagos de várzea. É considerado o segundo maior peixe de escamas da América do Sul, depois do pirarucu – *Arapaima gigas*, pois possui grande porte, podendo atingir no seu habitat natural até 100 cm de comprimento e mais de 30kg (SANTOS *et al.*, 2006). Contudo, já foram registrados exemplares com comprimento e peso recordes de 108 cm (IGFA, 2001) e 40 kg de peso vivo (MACHACEK, 2007).

Peixe tropical de água doce e ambiente bentopelágico (RIEDE, 2004), vive naturalmente em faixas de temperatura e pH variando entre 22 a 28°C e 5,0 a 7,8 respectivamente. De hábito alimentar onívoro, consome basicamente frutos e sementes, tendo zooplâncton como complemento. É o único peixe de grande porte na Amazônia que possui rastros branquiais longos e fortes dentes molariformes, sendo uma característica anatômica singular que lhe permite este tipo de alimentação. A atividade alimentar desta espécie é baixa no período de vazante e seca, quando ela empreende migrações ascendentes, de dispersão e utiliza suas reservas de gordura acumuladas no fígado e cavidade abdominal. Por outro lado, a atividade alimentar é muito alta por ocasião da enchente/ cheia, quando ocupa florestas inundadas nas margens dos rios e lagos e onde há maior disponibilidade de itens alimentares (SANTOS *et al.*, 2006). Alguns autores citam como parte de sua alimentação, além dos itens já mencionados, insetos, lesmas e plantas em decomposição (LOVSHIN, 1995; GOULDING, 1996; e SILVA *et al.*, 2000).

O tambaqui é uma das espécies nativas que se destaca na América Latina devido ao seu elevado valor comercial e sua grande importância econômica e social. Possui potencial para a aquíicultura, pois se adapta ao confinamento e arraçoamento (SILVA, *et al.*, 2007), além de apresentar excelentes qualidades zootécnicas e grande valor de mercado. Sua produção em confinamento nos últimos anos vem aumentando cerca de 11,5% da produção nacional em todo o país (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Segundo NUNES *et al.* (2006) tem grande capacidade de digerir proteína animal e vegetal e é de fácil adaptação à alimentação fornecida em sistemas de criação.

Sua carne tornou-se muito popular e bastante apreciada, pelo seu sabor e textura. No entanto, o aspecto mais crítico, é o crescente mercado de exemplares imaturos, cuja presença nos locais de comercialização vem se tornando rotina há

mais de uma década (FREITAS *et al.*, 2007). Embora dos peixes criadas no Brasil, os Characiformes constituam um dos principais grupos de peixes de água doce produzidas em confinamento, muitos estudos ainda são necessários para que a produção do tambaqui seja mais efetiva permitindo a redução da pressão sobre os seus estoques pesqueiros, principalmente no que diz respeito à redução de problemas ocasionados por enfermidades.

2.3 Probiótico

A piscicultura assemelha-se a criação de qualquer outro organismo vivo e como tal, a ocorrência de enfermidades, qualquer que seja ela, pode torná-la inviável. No entanto, as enfermidades podem ser devidamente controladas. Vários estudos têm procurado desenvolver produtos que possam ser utilizados para prevenir a ocorrência destas enfermidades e que sejam menos agressivos ao meio ambiente, entre as alternativas propostas, destacam-se os probióticos.

O conceito de probiótico surgiu a partir das observações de pesquisadores de que mediante a ingestão de microorganismos benéficos era possível controlar os microorganismos indesejáveis e os estudos de exclusão competitiva. Estas observações se basearam nas variações da microflora intestinal ocasionada por fatores de estresse como a temperatura inadequada, densidade de população elevada, a alimentação artificial e o manejo, do qual se refletia nas perdas de apetite, enfermidades e baixo crescimento (FOX, 1988; FULLER, 1989). O moderno conceito de probiótico foi formulado 34 anos atrás por PARKER (1974) e sua pertinência foi um desafio durante muitos anos para a comunidade científica. Várias definições de probióticos foram sucessivamente propostas (GATESOUBE, 1999). Originalmente, PARKER (1974), definiu probiótico como: “organismo e suas substancias que contribuem com a microflora intestinal”. Contudo, TANNOCK (1997) *In*: GATESOUBE (1999) notou que o efeito “balanço microbiano intestinal” não ocorria em muitos casos, propondo que a administração de células microbianas vivas como suplemento na dieta tem como objetivo melhorar a saúde.

Os mecanismos de ação dos probióticos, segundo FULLER (1989) podem ser enumerados em três, a supressão do número de células bacterianas viáveis mediante produção de compostos com atividades antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão; o segundo seria a alteração do metabolismo

microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática; e o terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos.

O efeito de probióticos sobre a imunidade tem induzido um grande número de pesquisas, sendo a maioria realizada em mamíferos (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004), apesar de ainda não estar esclarecido como estes atuam (CROSS, 2002). Este efeito pode estar relacionado à capacidade de os microorganismos do probiótico interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando linfócitos B produtores de IgA e a migração de linfócitos T do intestino (PERDIGÓN e HOLGADO, 2000). ÁVILA *et al.* (1998) compararam a eficiência de uma vacina específica e *Lactobacillus acidophilus*, e da associação destes dois produtos no controle da diarreia por *Escherichia coli* enterotoxigênica em leitões, e demonstraram que os melhores resultados foram obtidos com a combinação de vacina e probiótico. VITINI *et al.* (2000) testaram a influência da administração oral de diferentes espécies de bactérias ácido lácticas tais como *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* sub. sp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*, e verificaram que o aumento da produção de IgA nem sempre esteve correlacionado com o aumento no número de linfócitos T CD4⁺ (células produtoras de linfocinas que ativam outras células do sistema imune), indicando que algumas bactérias testadas somente induziram ativação dos linfócitos B produtores de IgA. Também foi observado que não houve influência sobre os linfócitos T CD8⁺ (células citotóxicas que matam outras células pelo contato), indicando que essas bactérias não foram capazes de induzir citotoxicidade.

Segundo COPOLLA e GIL-TURNES (2004), os probióticos, além de sua atividade como promotores de crescimento e reguladores de microbiota das mucosas, tem efeito imunomodulador, embora a forma de ação seja pouco conhecida. Segundo os autores, as evidências acumuladas sobre os benefícios decorrentes do uso dos probióticos justificam o aprofundamento destes estudos sobre seu modo de ação, a fim de otimizar sua utilização como profiláticos, promotores de crescimento e imunoestimulante.

A utilização do probiótico, que apresenta como ingrediente ativo esporos de *Bacillus subtilis*, promove o equilíbrio da microbiota intestinal e tem demonstrado efeitos positivos nas criações de animais.

2.3.1 Probiótico e sua aplicação na produção animal

O desempenho de frangos de cortes alimentados com rações contendo probióticos, não demonstra efeitos sobre o desempenho produtivo no período de 1 a 42 dias de idade, embora no período de 1 a 21 dias as aves que consumiram rações com antibióticos e probióticos tiveram melhor conversão alimentar (SILVA *et al.*, 2000).

A utilização de antibiótico e probióticos como promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte mostram que as variáveis consumo de ração, ganho de peso, conversão e eficiência alimentar, não foram afetados pelo uso dos complementos na ração (CORRÊA *et al.*, 2003). Contudo, observaram em frangos alimentados com dieta contendo *Bacillus subtilis*, melhora na conversão alimentar e também como promotor de crescimento, substituindo o uso de antibióticos. SOHAIL *et al.* (2002), também observaram melhora na qualidade dos ovos em frangos alimentados com dieta à base de *Bacillus subtilis*.

MICHELAN *et al.* (2002) utilizaram o probiótico Calsporin[®], ácido orgânico e antibiótico para coelhos em crescimento visando avaliar as dietas em um ensaio de digestibilidade, morfometria intestinal e desempenho. Neste trabalho puderam concluir que, a presença do probiótico, ácido fumárico e bacitracina de zinco, isolados ou combinados, não influenciaram na utilização digestiva dos nutrientes e nem as características morfométricas do jejuno. Contudo, a presença do probiótico, combinado ou não, não proporcionaram os melhores resultados de peso e crescimento.

Ao utilizarem probiótico, prébiótico, simbiótico e antibiótico em ração de leitões ao desmame, SANCHES *et al.* (2006) concluíram que, a adição destes aditivos na dieta, proporcionou desempenho semelhante ao obtido com o antibiótico, demonstrando a viabilidade da utilização dos mesmos em detrimento ao uso do antibiótico, mantendo o mesmo padrão de desempenho animal.

2.3.2 Probiótico e sua aplicação na criação de organismos aquáticos

Diversos autores como RINGO *et al.* (1996); AUSTIN, (1998) e O'SULLIVAN, (1999), têm demonstrado a importância do uso dos probióticos na aquicultura, ressaltando o seu grande interesse no estudo do sistema imune.

BOYD e QUEIROZ (2004) destacaram o uso de probióticos como alternativa para melhorar os benefícios dos processos químicos e biológicos em tanques de criação de peixes. MORIARTY (1998) relatou que dietas contendo probióticos melhoram a qualidade da

água e a saúde dos peixes. Segundo GATESOUBE (1999), os probióticos apresentam características benéficas à saúde dos animais aquáticos, como o efeito antagonista sobre os patógenos, a estimulação do sistema imune e a resistência do hospedeiro contra as doenças.

RAIDA *et al.* (2003), demonstrou que a administração de vários produtos microbianos nas dietas para peixes em sistema de criação proporciona maior sobrevivência quando expostos a diversos patógenos.

MEURER *et al.* (2006), utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico em rações para tilápias-do-Nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário, observaram que houve a colonização do probiótico no intestino. Contudo, concluíram que a utilização deste probiótico não influenciou no desempenho e na sobrevivência.

Ao estudar a influencia do uso de diferentes dosagens do probiótico Estibion® no crescimento de carpa comum, *Cyprinus carpio*, na fase de recria, GRAEF e MONDARDO (2006), relataram que nas condições experimentais testadas (dosagens 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,10%), o uso do probiótico não propiciou melhorias nos resultados de desempenho como ganho de peso, comprimento e conversão alimentar.

KUMAR *et al.* (2006) observaram maior sobrevivência em carpa *Labeo rohita* alimentada com *Bacillus subtilis*, submetida à injeção intraperitoneal com *Aeromonas hydrophila*. PANIGRAHI *et al.* (2005) observaram o efeito da dieta do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* em truta, *Oncorhynchus mykiss*, relatando a indução do sistema imune. KUMAR *et al.*, (2008) ressaltou que o uso de bactéria *Bacillus subtilis* aumenta a resposta imune dos peixes.

SUGITA *et al.* (1998), sugerem que o *Bacillus* sp pode ser usado como agente de biocontrole no intestino dos peixes e nas águas de criação, uma vez observado a alta atividade do probiótico contra o patógeno *Vibrio vulnificus*. MORIARTY (1998) comentou que o uso do probiótico (*Bacillus* sp.) em criação de camarões ocasionou maior sobrevivência dos animais e promoveu a diminuição de *Vibrio* sp. na água dos tanques e no sedimento.

2.3.3 Seleção de probiótico

De acordo com VINE *et al.* (2004), a seleção de probióticos para a aquicultura é usualmente baseada no antagonismo entre microrganismos e agentes patogênicos. Estes mesmos autores ainda salientam que esta seleção pode ser realizada através de outros

critérios como: o gênero ao qual pertence a bactéria, a estabilidade frente ao ácido gástrico e à bile, a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente o trato gastrointestinal, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos a ser metabolicamente ativo no intestino (COLLINS *et al.*, 1998 e SAARELA *et al.*, 2000). Entre os microorganismos empregados como probióticos, destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. longum* e *B. thermophilum*) e *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*) e, em menor escala, as bactérias *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus* (COLLINS *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999; SANDERS e KLAENHAMMER, 2001).

Contudo, a produção ou o efeito de metabólicos inibidores dependem dos meios em que o probiótico é cultivado (OLSSON *et al.*, 1992). Sendo assim, os autores ressaltaram que testes adicionais, que possam avaliar a produção de metabólicos antimicrobiais na mucosa intestinal do peixe, devem ser realizados para verificar suas conclusões preliminares e para esclarecer *in vivo* os fatores provenientes desses efeitos e a classificação dos candidatos a probióticos para aquicultura. Além disso, sugeriram que os métodos desenvolvidos neste estudo podem ajudar no processo de seleção de probióticos na nutrição humana e de animal terrestre.

2.4 Espirulina

Além dos probióticos, outros microrganismos são estudados para a inclusão em dietas para produção animal. Entre eles, encontra-se o uso da espirulina.

Espirulina é uma alga verde azulada de forma helicoidal, com comprimento de 0,2 - 0,5mm. Existem espécies que vivem em água marinha e outras típicas de água doce, mas o destaque é para aquelas de interesse alimentar (*Spirulina maxima*, *S. platensis*, *S. fusiformis*) que se encontram predominantemente nas quentes águas doces das zonas tropicais e subtropicais, caracterizadas por altas concentrações alcalinas (pH 11 e outros). ROGATTO *et al.* (2004) comentam ainda que a alga cresce normalmente em águas de lagos naturalmente alcalinos, localizados em zonas áridas. Embora a água desses lagos não possa ser usada para irrigação, pode ser utilizada para o cultivo de espirulina (FURST, 1978). Uma vez que essa alga tem rápida taxa de reprodução, dividindo-se três vezes ao dia, uma área devotada totalmente ao crescimento de espirulina

pode produzir 125 vezes mais proteína que área de mesma dimensão voltada ao cultivo de milho; ou 70 vezes mais do que se voltada à criação de gado (FURST, 1978).

Além disso, a espirulina possui algumas vantagens sobre as outras algas, dentre as quais podemos citar paladar agradável, não apresenta problemas na sua digestão e nem toxicidade aparente aos humanos, o que não acontece com outras algas tais como *Chlorella* e *Scenedesmus* (CONTRERAS *et al.*, 1979). Apresenta, ainda, ações antioxidantes e hipocolesterolêmica (RODRIGUEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2001).

O conhecimento das suas propriedades nutricionais e extra-nutricionais é recente. Ao que se refere o primeiro aspecto, pode-se destacar que estas algas são caracterizadas por altas percentagens de vários princípios nutritivos, como por exemplo: proteínas bruta 71% (constituídas por 18 aminoácidos, muitos dos quais essenciais); betacaroteno (vitamina A) 110mg/kg; cianocobalamina (vitamina B12) 2 mg/kg; e tocoferol (vitamina E) 190mg/kg.

2.4.1 Espirulina e sua aplicação na produção animal

GRINSTEAD *et al.* (2000) avaliaram o efeito da *Spirulina platensis* na dieta de suínos como fator de crescimento e obtiveram mínima taxa de crescimento.

Estudando a toxicidade de *Spirulina maxima* nas concentrações de 10, 20 e 30% nas dietas de camundongos, SALAZAR *et al.* (1998) observaram que os altos níveis de espirulina nas dietas não demonstram efeitos sub-crônicos e alterações hematológicas, apenas aumento nos níveis de colesterol sérico nas concentrações de 20 e 30%.

Estudo sobre o efeito preventivo da *Spirulina maxima* sobre fígado gordo induzido por tetracloreto de carbono em ratos, mostra o potencial protetor da espirulina no fígado (TORRES-DURÁN *et al.*, 2001).

2.4.2 Espirulina e sua aplicação na criação de organismos aquáticos

A alga espirulina é considerada um microorganismo promissor em dietas para organismos aquáticos, devido ao seu alto teor protéico (65 a 70% de seu peso seco) e abundância em vitaminas e minerais (CONTRERAS *et al.*, 1979; KAY, 1991). É estudada também como suplemento alimentar, por apresentar carotenóides e carotenoproteínas, sendo estas responsáveis por várias colorações em peixes (BRITTON

et al., 1981). Segundo SHETTY e NANDEESHA (1988), devido seu elevado valor protéico, a espirulina atua como fonte de alimento alternativo nas rações para peixes, substituindo outros itens protéicos de alto custo.

NAKAGAWA (1997) comentou que dietas contendo algas melhoram as condições fisiológicas dos peixes, como crescimento, metabolismo lipídico e as respostas ao estresse e a resistência a doenças.

LORENZ (1999) observou em *Macrobrachium rosenbergii* alimentados com dieta contendo espirulina, aumento no crescimento e na sobrevivência. Segundo o mesmo autor, o desenvolvimento adiantado do sistema imune para a proteção dos animais contra os patógenos oportunistas é de fundamental importância.

BOROWITZKA (1999) ressaltou que a cultura comercial de microalgas é utilizada por mais de 30 anos, sendo a *Chlorella* sp e a *Spirulina* sp as principais espécies de microalgas cultivadas para a saúde alimentar, fornecendo b-caroteno e astaxantina, sendo estes muito empregados na aquicultura.

NANDESSHA *et al.* (2001) verificou a influência da *Spirulina platensis* incorporada na dieta de carpa *Catla catla* como fator de crescimento e composição da carcaça, evidenciando altas porcentagens de gordura. O efeito da dieta com algas em peixes melhora o metabolismo lipídico e acelera a assimilação do ácido ascórbico (NAKAGAWA, 1997).

Através de análises sensoriais de textura e gordura de polpas de tilápia *Oreochromis niloticus* alimentados exclusivamente com *Spirulina platensis*, LU *et al.*, (2003) demonstraram a alta qualidade de sua carne para o uso como sashimi.

LU e TAKEUCHI (2004) relataram que a *Spirulina platensis* é mais aceitável do que *Euglena gracilis* e *Chlorella vulgaris* como dieta de larvas de tilápia *Oreochromis niloticus* no início da alimentação exógena.

ABDEL-FATTAH *et al.* (1999) demonstrou que a farinha de espirulina substituindo a farinha de peixe na dieta de *Rhabdosargus sarba*, não altera seu desenvolvimento e crescimento. O mesmo foi observado por PALMEGIANO *et al.* (2004) em um trabalho realizado com esturjão, *Acipenser baeri*. WATANUKI *et al.* (2006) observou efeito imunestimulante do sistema imune inato em carpa *Cyprinus carpio* alimentada com *Spirulina plantensis*.

2.5 Avaliação de anormalidades em peixes por análises hematológicas

Vários autores enfatizam que os conhecimentos das anormalidades existentes no sangue e órgãos constituem um meio valioso e seguro na avaliação das condições biológicas, bioquímicas e patológicas nos peixes (KAVAMOTO *et al.*, 1983; RANZANI-PAIVA e GODINHO, 1985; RIBEIRO *et al.*, 1999).

As alterações das variáveis sanguíneas nos peixes estressados geralmente são acompanhadas de hiperglicemia, hematócrito, concentração da hemoglobina e número de linfócitos (URBINATI e CARNEIRO, 2001).

BARCELLLOS *et al.*, (2004) relata a diminuição do número de linfócitos, monócitos, eosinófilos, eritrócitos e hematócrito em jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a estresse crônico. RIBEIRO *et al.* (2006) observou o aumento do número de leucócitos e do volume corpuscular médio em *Hoplias malabaricus* alimentadas com dietas contendo metilmercúrio. A exposição de carpa maior *Catla catla* a mudança de pH de ácido para alcalino, resultou em estresse provocando a redução do número de eritrócitos e da concentração de hemoglobina e aumento do número de leucócitos (DAS *et al.*, 2006). TAVARES-DIAS *et al.* (2002) em um estudo das características hematologias do jundiá *Rhamdia quelen*, observou o número de trombócitos e linfócitos como sendo as células mais freqüentes nas extensões sanguíneas. Em *Prochilodus scrofa*, durante os vários estádios gonadais, RANZANI – PAIVA e GODINHO (1986) relatam que os basófilos foram às células mais freqüentes durante a maturação gonadal e eosinófilos não ocorrendo em nenhum dos estádios. RANZANI – PAIVA *et al.* (2001) comenta que não foram vistas correlações das variáveis hematológicas quando analisadas por sexo, estágio de maturação gonadal e comprimento total do dourado *Salminus maxillosus* coletados no rio Mogi-Guaçu em cachoeira das Emas.

De acordo com TAVARES-DIAS e MORAES (2003), a piscicultura tem necessidade de informações acuradas sobre a identificação e controle de situação de estresse e/ ou enfermidades, a fim de assegurar a saúde dos peixes. SILVEIRA-COFFIGNY *et al.* (2004), baseados em outros estudos, salientam que a hematologia é usada como índice do status de saúde do peixe, onde é possível notar alterações fisiológicas quando estes são submetidos a diferentes tipos de estresse.

Segundo MELINGEM *et al.* (2002), existem uma variedade dos tipos de leucócitos em peixes, envolvendo células de defesa não específica, incluindo

monócitos/macrófagos e granulócitos e células citotóxicas não-específicas. As células sangüíneas como os monócitos - macrófagos, apresentam importância fundamental na defesa do organismo, pois participam em praticamente todas as reações imunes contra doenças e agressões nos peixes (ZELIKOFF *et al.*, 1991).

Os macrófagos, portanto, são considerados, entre os teleósteos, como o tipo celular de leucócitos mais eficiente na fagocitose de patógenos e restos celulares resultantes do processo inflamatório e de outros tipos de processos degenerativos (BODAMER e ROBOHM, 1996). De acordo com as evidências descritas por alguns autores (ALEXANDER e INGRAM, 1992; BLY e CLEM, 1992 e SIWICKI *et al.*, 1994), os peixes mostram similaridade ao sistema imunológico dos mamíferos.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o quadro hematológico e a formação de células gigantes em jovens de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas contendo dois aditivos promotores de saúde, submetidos a duas densidades de estocagem, com ou sem lesão tecidual.

Objetivos específicos

- a) Avaliar as variáveis hematológicas de tambaqui *Colossoma macropomum* jovem, alimentados com dietas contendo probiótico ou espirulina, submetidos a diferentes densidades de estocagem, 5 e 20 kg/m³ com implante e sem implante de lamínula.
- b) Avaliar o efeito das diferentes densidades de estocagem, 5 e 20 kg/m³ com implante e sem implante de lamínula, sobre o perfil glicêmico de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas contendo probiótico ou espirulina.
- c) Avaliar a produção de células gigantes em lamínulas implantadas em jovens de tambaqui, *Colossoma macropomum* alimentados com dietas contendo probiótico ou espirulina.
- d) Verificar a influência das dietas contendo probiótico ou espirulina na sobrevivência de jovens de tambaqui, *Colossoma macropomum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM, Manaus – AM.

4.1 Ração

Durante a fase experimental foi fornecida ração comercial (Tabela 1) com 36% PB e suplementada de acordo com as diferentes dietas alimentares (probiótico e espirulina).

Tabela 1 – Composição aproximada da ração comercial utilizado no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum*.

Nutrientes	
Umidade (max.)	13,0%
Matéria Mineral (max.)	14,0%
Matéria Fibrosa (max.)	7,0%
Proteína Bruta (min.)	36,0%
Extrato Etéreo (max.)	4,0%
Cálcio (max.)	2,5%
Fósforo (min.)	0,6%

Mat. Mineral - magnésio 700mg; ferro 100mg; cobre 15mg; zinco 200mg; manganês 30mg; iodo 1mg ; selênio 0,3mg. **Vitamina** - vitamina A 12000Ul; vitamina D3 4000Ul; vitamina E 150Ul; vitamina K 10Ul; ácido fólico 10mg; biotina 0,8mg; colina 500 mg; niacina 150 mg; pantotenato de cálcio 50mg; tiamina 30mg; riboflavina 30mg; piridoxina 30mg; vitamina B12 35 mcg; vitamina C 300 mg **

4.2 Ingredientes biológicos utilizados nas dietas

Foram utilizados dois produtos comerciais (em pó) como ingredientes complementares à ração comercial (Tabela 2).

Tabela 2 – Princípio ativo dos ingredientes adicionados à ração de tambaqui *Colossoma macropomum*.

Produto	Princípio Ativo	Nome Comercial
Probiótico	<i>Bacillus subtilis</i>	Calsporin [®]
Alga	<i>Spirulina maxima</i>	-

Os ingredientes biológicos foram adicionados à ração comercial extrusada, utilizando-se óleo de soja como veículo, para garantir que os produtos não se dispersassem na água ou fossem ativados antecipadamente. As dietas foram ministradas pelo período de três meses antes da realização do bioensaio. A concentração de probiótico recomendada pelo fabricante é 0,001g/kg ração. Entretanto no presente experimento utilizou-se concentração maior (1g/kg ração), pois a recomendação do fabricante do probiótico calsporin[®] é para aves e suínos, não possuindo recomendações para peixes. A concentração de espirulina utilizada no experimento foi baseada nas concentrações utilizadas e respostas encontradas por alguns autores (CHOUBERT, 1979; LORENZ, 1999; NANDEESHA *et al.*, 2001) e estão apresentadas na Tabela 3. Após o preparo das dietas, a ração foi estocada em sacos plásticos e mantida a 4 °C até o momento do uso.

Tabela 3 – Tratamentos, concentração por ingredientes adicionados por kg de ração, veículo (óleo de soja) e unidades formadoras de colônia (UFC/g) utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum*.

Tratamento	Dose	Ração	Óleo	UFC/g
Controle		1kg	20mL	-
Probiótico <i>Bacillus subtilis</i>	1g	1kg	20mL	1x10 ⁹
Alga <i>Spirulina maxima</i>	5g	1kg	20mL	-

4.3 Acondicionamento dos peixes

Foram utilizados alevinos de tambaqui, *Colossoma macropomum*, proveniente de piscicultura comercial, com peso médio de $1,32 \pm 0,05$ g e comprimento médio de $4,1 \pm 0,3$ cm. O processo de aclimação iniciou-se com o acondicionamento dos peixes em tanque de alvenaria com capacidade de 10.000 L, dotado de aeração e renovação constante de água, sendo este tanque utilizado para crescimento dos alevinos. Os peixes permaneceram neste tanque, durante três meses até a fase de jovem. Durante este período a alimentação foi fornecida em forma de ração farelada, com 45% de proteína bruta (PB).

4.4 Aclimação

Após os três meses, os animais foram transferidos para três caixas de água onde permaneceram por uma semana, sendo alimentados com a dieta controle durante este período. Anteriormente ao início do experimento, foi realizada uma pré-seleção dos jovens através de exame macroscópico para que não fosse incluído nas unidades experimentais algum exemplar portador de alguma deficiência, e feito raspado de pele e brânquia para a visualização de possíveis parasitos.

4.5 Início do experimento com as dietas

Foram utilizados 750 tambaquis jovens com comprimento médio de $10,6 \pm 1,5$ cm e peso médio de $26,1 \pm 7,1$ g distribuídos em três caixas de água de 500 L cada, sendo 250 peixes por caixa, durante período de três meses (Figura 2), formando três grupos:

- Grupo 1 - ração controle
- Grupo 2 - ração controle suplementada com espirulina.
- Grupo 3 - ração controle suplementada com probiótico.



Figura 1 - Caixas de água de 500 L utilizadas no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina

4.6 Manejo das caixas

As caixas eram dotadas de sistema renovação constante da água através de filtração biológica (Figura 3) visando manter a qualidade da água principalmente no que diz respeito à presença de matéria orgânica e níveis de amônia. Uma vez por semana era realizada a limpeza dos filtros e em dias alternados, o sinfonamento das caixas com o auxílio de mangueira.



Figura 2 – Visualização do esquema de filtragem biológica utilizada no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina.

4.7 Bioensaio – Implantação de lamínula

Após três meses de alimentação dos peixes com as diferentes dietas nas caixas de água, os peixes foram acondicionados em 36 caixas plásticas com capacidade de 50 L cada, sendo estas as unidades experimentais (Figura 4). As caixas eram dotadas de aeração e renovação constante de água. Nas caixas os peixes foram estocados em duas diferentes densidades: 5 kg/m³ e 20 kg/m³ sendo esta última densidade utilizada como agente estressante para os peixes. Foram feitos seis tratamentos, cada tratamento com peixes implantados (I) e peixes sem implantes (SI), apresentando três repetições cada, sendo:

- T1 – ração controle com densidade 5 kg/m³ com (I).
- T1 – ração controle com densidade 5 kg/m³ com (SI).
- T2 – ração suplementada com probiótico e densidade 5 kg/m³ com (I).
- T2 – ração suplementada com probiótico e densidade 5 kg/m³ com (SI).
- T3 – ração suplementada com espirulina e densidade 5 kg/m³ com (I).

- T3 – ração suplementada com espirulina e densidade 5 kg/m³ com (SI).
- T4 - ração controle com densidade 20 kg/m³ com (I).
- T4 - ração controle com densidade 20 kg/m³ com (SI).
- T5 – ração suplementada com probiótico e densidade 20 kg/m³ com (I) .
- T5 – ração suplementada com probiótico e densidade 20 kg/m³ com (SI).
- T6 – ração suplementada com espirulina e densidade 20 kg/m³ com (I).
- T6 – ração suplementada com espirulina e densidade 20 kg/m³ com (SI).



Figura 3 – Caixas plásticas de 50 L utilizadas no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum*, com diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina.

Antes do início do bioensaio, foram coletados oito peixes de cada caixa de água referente ao experimento com as dietas, selecionados ao acaso para as análises hematológicas, sendo este considerado o tempo zero. No decorrer do experimento a amostragem de 2 indivíduos por unidade experimental, nos intervalos de 3, 7, 10 e 12 dias para avaliação dos efeitos das dietas através das alterações hematológicas, bioquímicas e número de células gigantes. Para a manutenção das densidades de estocagem em teste, as unidades experimentais eram drenadas na quantidade adequada, mantendo as proporções 5 e 20 kg/m³.

4.7.1 Monitoramento da qualidade da água

Semanalmente no período da manhã, foram analisados: o potencial hidrogeniônico (pH), a condutividade elétrica, a concentração de oxigênio dissolvido e a temperatura, através do equipamento YSI – 63 e YSI – 55.

4.7.2 Implante de lamínula

Uma vez que os macrófagos possuem a capacidade de se aderir e espalhar sobre as superfícies de vidro (PETRIC, 2000; BELO, 2002 e BRUM, 2003), foram realizados os implantes de lamínulas circulares de vidro de 10 mm de diâmetro no tecido subcutâneo da região latero-dorsal, atrás do opérculo esquerdo na altura do início da nadadeira dorsal. Para isto, os peixes foram anestesiados com benzocaína, feita a assepsia regional e retirada de escamas com auxílio de lâmina de bisturi, sendo feita uma pequena incisão. O tecido subcutâneo foi divulsionado com tesoura previamente esterilizada, sendo a lamínula esterilizada em bico de Bunsen e implantada. O peixe foi suturado e mantido sob observação até a sua completa recuperação da anestesia. Para prevenção de infecções no local da sutura, foi passado algodão embebido em iodo como anti-séptico.

Para os implantes foram utilizados oito peixes de doze unidades experimentais, referentes ao grupo com implante em cada densidade (5 kg/m^3 e 20 kg/m^3), totalizando 144 peixes.



Figura 4 – Implante da lamínula de vidro no tecido subcutâneo da região latero-dorsal em experimento com tambaqui *Colossoma macropomum*, em diferentes densidades de estocagem, alimentado com dietas contendo probiótico e espirulina.



Figura 5 – Sutura no local do implante da lamínula de vidro em experimento com tambaqui *Colossoma macropomum*, com diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina.

4.7.3 Coleta das lamínulas

As lamínulas foram retiradas nos intervalos de três, sete, dez e doze dias após o implante e lavadas em solução salina 0,65%, para eliminação das células não aderidas (não macrófagos) segundo PETRIC (2000). Posteriormente, as lamínulas foram fixadas em solução de Bouin por cerca de cinco minutos e coradas com hematoxilina-eosina.

4.7.4 Contagem de células

Para a visualização das células presentes nas lamínulas foi utilizado microscópio de luz, em aumento de 40x e feita a média de contagem de 10 campos da lamínula, escolhidos aleatoriamente. Os macrófagos poliariontes foram contados quanto ao número de núcleos presentes nas células, o número de gigantócitos tipo corpo estranho e do tipo Langhans.

4.7.5 Análises hematológicas

Para as análises hematológicas, os peixes foram retirados das caixas, anestesiados com benzocaína e o sangue imediatamente retirado por punção caudal (Figura 5), com auxílio de seringas descartáveis heparinizadas, para determinação de:

- Número total de células e contagem de leucócitos, em câmara de Neubauer, utilizando a solução de NATT & HERRICK (1952) como diluente.
 - Contagem diferencial dos leucócitos em extensões sangüíneas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa, segundo ROSENFELD (1947).
 - Hematócrito, pelo método do microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971).
 - Taxa de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944).
- Com os resultados da taxa de hemoglobina (Hb), do número total de células (Er) e do hematócrito (Ht) foram calculados os índices hematimétricos: VCM, HCM e CHCM.



Figura 6 – Coleta de sangue por punção caudal em experimento com tambaqui *Colossoma macropomum*, em diferentes densidades de estocagem, alimentado com dietas contendo probiótico e espirulina.

4.7.6 Análises bioquímicas de sangue

A concentração de glicose sanguínea foi determinada com o auxílio de medidor eletrônico de glicose sanguínea (Accu-Chek-AdvantageII). Aproximadamente 10 μ L de sangue total são colocados nas fitas de leitura do aparelho, que por meio de análise eletroquímica da amostra, apresenta a concentração de glicose em g/dL.

4.7.7 Dados biológicos

Após a coleta de sangue os animais foram medidos (comprimento médio inicial CMI e final CMF) e pesados (peso médio inicial PMI e peso final PMF), utilizando-se ictiômetro e balança eletrônica Filizola[®] com capacidade de um quilograma respectivamente (Figura 1), para cálculo do desempenho zootécnico dos peixes alimentados com as dietas contendo probiótico e espirulina.

Os dados de mortalidade foram registrados diariamente antes do fornecimento das dietas experimentais.



Figura 7 – Biometria dos tambaquis *Colossoma macropomum* utilizados no experimento alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina.

4.7.8 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento experimental casualizado, em esquema fatorial $3 \times 2 \times 2$, sendo três dietas (ração controle, ração controle suplementada com probiótico e ração controle suplementada com espirulina); duas densidades de estocagem (5 e 20 kg/m³), e em cada densidade grupos de peixes com lamínulas implantadas (I) e grupos de peixes sem lamínulas implantadas (S), totalizando 12 tratamentos com três repetições cada.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM do SAS[®] (1998) e a significância entre as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Durante todo o experimento não foram observadas alterações nos valores das variáveis físicas e químicas da água, permanecendo dentro dos limites aceitáveis (SILVA e CARNEIRO, 2007). Os teores de amônia foram mantidos em níveis baixos, devido à renovação constante de água, média de 2,9 L/hora e filtragem biológica O sifonamento do fundo das caixas e a renovação constante de água impediram o acúmulo de matéria orgânica, garantindo a manutenção da qualidade da água (Tabela 4).

Tabela 4 – Médias das variáveis físicas e químicas da água utilizada no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.

Parâmetros da água	Controle	Probiótico	Espirulina
Temperatura (°C)	27,03 ± 0,07	27,03 ± 0,06	27,03 ± 0,07
Oxigênio dissolvido (mg/L)	3,53 ± 0,16	3,80 ± 0,22	3,43 ± 0,13
pH	5,42 ± 0,03	5,49 ± 0,02	5,58 ± 0,03
Condutividade(µS/cm)	25,85 ± 2,54	25,56 ± 1,19	25,93 ± 0,86

De acordo com RIEHI e BAENSCH (1991), o tambaqui habita águas doces tropicais com pH que variam entre 5,0 – 7,8 e temperaturas entre 22 -28oC. SILVA e CARNEIRO (2007), monitorando a qualidade da água ao longo do período de engorda de tambaqui em sistema de criação semi-intensiva em viveiros de terra sem renovação de água e obtiveram resultados médios de temperatura, oxigênio dissolvido e pH igual a: 28,4 °C; 1,7 mg/L e 7,0, respectivamente. OLIVEIRA et al. (2007) avaliando o efeito da densidade de estocagem sobre a qualidade da água na criação de tambaqui em tanques fertilizados, obtiveram boa qualidade com relação à maioria dos parâmetros (pH, alcalinidade, transparência, nitrito e amônia) com exceção do oxigênio dissolvido que apresentou valores abaixo do recomendado (3,10; 2,55 e 2,34), mas que, no entanto não prejudicaram o desenvolvimento desses peixes. Comparando com os dados obtidos para a qualidade da água mantida durante todo o experimento, podemos destacar que o tambaqui apresenta boa adaptação a diferentes sistemas, entre eles, as condições de

laboratório, corroborando com os as características descritas por outros autores (SILVA, *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2006) para esta espécie e o seu potencial para a aquíicultura.

Os dados de desempenho de juvenis de tambaquis obtidos após três meses de alimentação com dietas contendo Probiótico e dietas contendo espirulina encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Desempenho zootécnico – peso médio inicial (PMI) e final (PMF) ganho de peso médio (GPM), comprimento médio inicial (CMI) e comprimento médio final (CMF), de juvenis de tambaqui alimentados durante 90 dias com dietas contendo probiótico e espirulina.

Tratamentos	PMI (g)	PMF (g)	GPM (g)	CMI (cm)	CMF (cm)
Controle	29,00±4,08	106,9±33,6	77,9	10,09±1,70	15,76±2,44
Probiótico	26,07±7,08	122,7±19,45	96,63	10,64±1,49	17,46±1,29
Espirulina	24,59±7,72	99,6±23,12	75,01	10,73±1,48	15,08±1,66

Embora não tenha ocorrido diferença estatística entre os tratamentos, foi possível notar através dos dados da Tabela 5, efeito positivo sobre o ganho de peso de peixes alimentados com dietas suplementadas com probiótico. Neste tratamento os peixes apresentaram, no final do experimento, peso médio cerca de 20% maior que os do grupo controle e dos suplementados com espirulina.

Não ocorreu mortalidade no grupo alimentado com probiótico, independente da densidade de estocagem e presença ou ausência de lamínula. No grupo controle nas densidades de 5 e 20 kg/m³ ocorreram 54,16 e 52% de mortalidade, respectivamente;. Além disso os peixes neste grupo apresentaram necrose tecidual avançada durante o experimento, a partir do sétimo dia de coleta. O grupo que recebeu dieta contendo espirulina apresentou 18,33% de mortalidade apenas na densidade de 20kg/m³.

Nas Figuras 8 e 9, estão representados os dados de valores médios dos parâmetros hematológicos dos peixes do bioensaio. Por estas figuras verifica-se que os valores médios da Hb oscilaram durante todo o período de coleta, sendo mais marcante no terceiro dia tanto para os indivíduos com implante de lamínula, quanto para os sem implante suplementados com espirulina, nas duas densidades, com diferenças estatísticas como representado nas figuras 8 e 9 pelas diferentes letras maiúsculas e minúsculas.

Para os valores médios de Ht, pode-se observar que embora tenha havido alguma diferença significativa estatisticamente (como demonstrado pelas diferentes letras nas figuras 8 e 9) entre os tempos de coleta, densidades, diferentes suplementações e implante de lamínula, estes permaneceram mais ou menos constantes durante todo o período do experimento.

Os valores médios do número de eritrócitos (Er) apresentaram declínio em todos os tratamentos, com aumento no décimo segundo dia de coleta e diminuição dos valores no décimo dia de coleta nas densidades de 5 kg/m³ e 20 kg/m³ com (I) e (SI). Os grupos implantados apresentaram maiores valores em relação aos grupos sem implante. Foi observado no último dia de coleta, elevação dos valores médios de Er, apenas no tratamento com espirulina, ocorrendo diferença estatística entre o grupo controle na densidade 5 kg/m³ e entre as dietas controle e probiótico na densidade 20 kg/m³.

As alterações hematológicas para a concentração de Hb, Ht e Er, no terceiro e décimo segundo dia de coleta para os peixes com implante de lamínula de vidro nas densidades de 5 e 20 kg/m³, evidencia estímulo estressante (ver figura 14 - glicose) que podem indicar a ocorrência de hemoconcentração ou hemodiluição, causadas por disfunção osmorregulatórias (HOUSTON *et al.*, 1996).

O aumento na concentração de hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos (hemoconcentração) durante a resposta ao estímulo estressante pode ser decorrente do aumento do consumo de oxigênio. Durante o estresse o aumento da hemoglobina sugere maior capacidade de transportar oxigênio pelo sangue, na tentativa de suprir o aumento da demanda energética (NIKINMAA *et al.*, 1983). O número elevado de eritrócitos na circulação sugere liberação dessas células pelo baço (PULSFORD *et al.*, 1994).

Os parâmetros hematológicos são alterados em diversas situações, tais como desnutrição, estresse, manejo, transporte e alta densidade populacional. Estudos de dietas deficientes de vitamina E em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (FRISCHKNECHT *et al.*, 1994) demonstraram diminuição significativa nos percentuais de hematócrito e contagem total de eritrócitos. TAVARES – DIAS *et al.* (2001) na avaliação da resposta inflamatória do tambaqui, *Colossoma macropomum*, submetidos ao estresse de captura e manejo, observou diminuição na contagem de células vermelhas e no hematócrito. BELO (2002), analisando o efeito do estresse, suplementação e formação de gigantócitos, relata que não observou diferença significativa para a contagem de eritrócitos e hematócrito entre os parâmetros hematológicos avaliados,

apesar de existirem resultados significativamente diferentes. DAS *et al.* (2006) comenta que o efeito do pH da água sobre os parâmetros hematológicos em três espécies de carpas, promove a produção de eritrócitos imaturos, redução da contagem total de eritrócitos e hemoglobina. As análises estatísticas no presente trabalho não demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$) para os valores médios dos parâmetros hematológicos vistos acima, também não houve interação desses parâmetros com os fatores de densidade, dieta e implante de lamínulas, embora os valores médios tenham variado nos diferentes tempos de coleta.

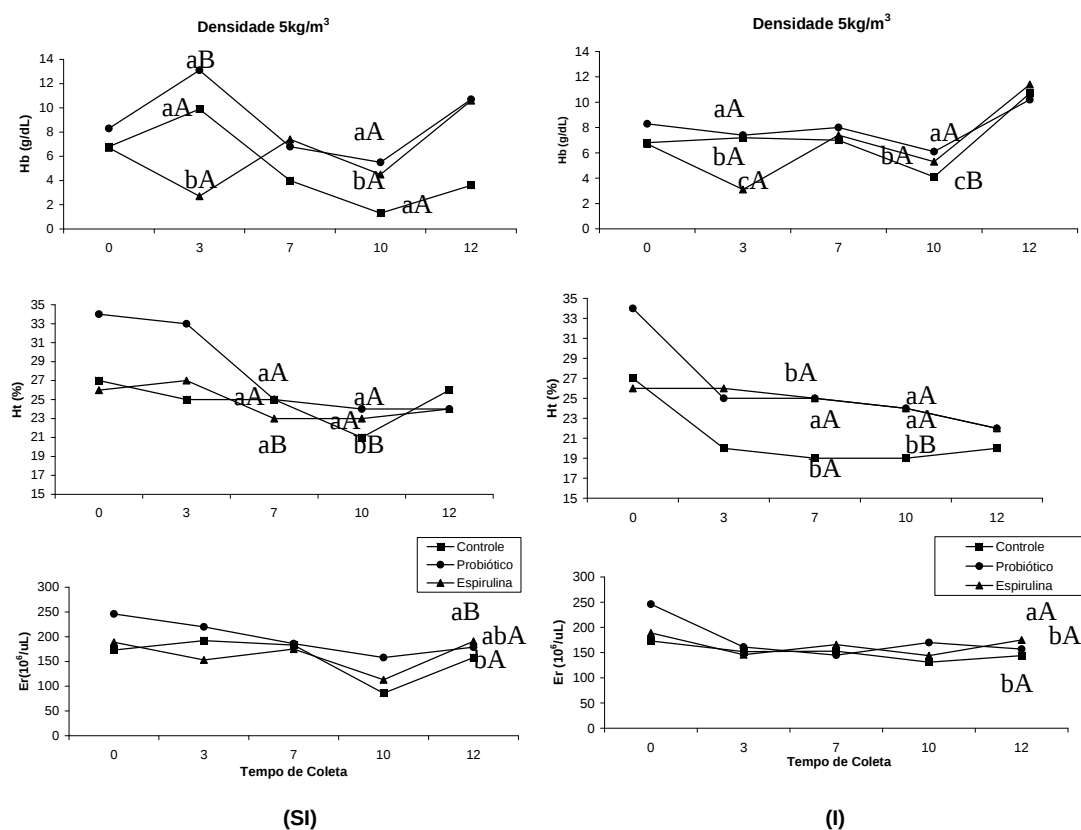


Figura 8 – Variação dos valores médios dos parâmetros hematológicos utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 5kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Hb = taxa de hemoglobina; Ht = hematócrito; Er = número de células

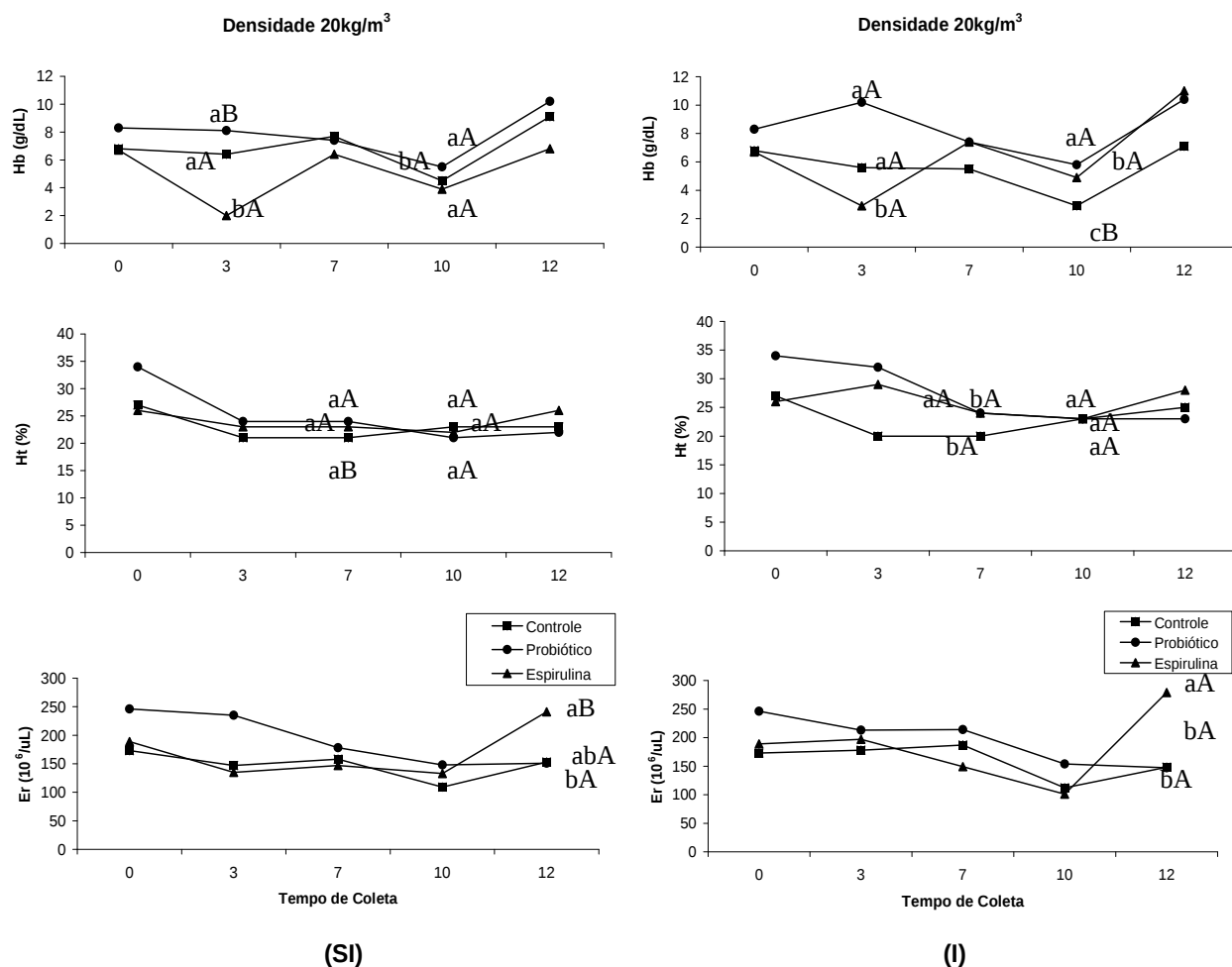


Figura 9 – Variação dos valores médios dos parâmetros hematológicos utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 20kg/m^3 , alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Hb = taxa de hemoglobina; Ht = hematócrito; Er = número de células

Os valores médios dos índices hematimétricos estão representados nas Figuras 10 e 11. As médias de VCM apresentaram elevação de seus valores no terceiro e décimo dia de coleta nas densidades de 5 kg/m^3 e 20 kg/m^3 com (I) e (SI). Os peixes dos tratamentos probiótico e espirulina apresentaram os valores médios de VCM mais elevados que o grupo controle. As diferenças estatísticas ocorreram no sétimo dia de coleta entre o fator dieta (letra minúscula) – densidade (letra maiúscula). O grupo controle diferiu do suplementado com probiótico nas densidades de 5 kg/m^3 e 20 kg/m^3 e dos grupos controle e dos suplementados espirulina na densidade de 20 kg/m^3 .

Ocorreu diminuição dos valores médios de VCM no décimo segundo dia de coleta nas duas diferentes densidades, com diferença estatística entre o fator dieta – densidade e dieta – implante de lamínula. O grupo controle na densidade de 5 kg/m³ (I) diferiu dos suplementados com probiótico e com espirulina na densidade de 5 kg/m³ (I) e do suplementado com espirulina na densidade de 20 kg/m³ (SI).

Ocorreu redução dos valores médios de HCM no terceiro e décimo dia de coleta nas densidades de 5 kg/m³ e 20 kg/m³ (I) e (SI), com aumento no sétimo e décimo segundo dia, sendo neste último mais acentuado. A análise estatística mostra diferença ($p < 0,05$) no fator dieta (letra maiúscula) – densidade (letra minúscula) no terceiro dia de coleta, entre Espirulina 5 kg/m³ (I) para probiótico e controle nas densidades 5 e 20 kg/m³ (I) e (SI). E controle 5 kg/m³ (I) para controle e probiótico 20 kg/m³ (S). No décimo dia de coleta, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as densidades, apenas no fator dieta (letra maiúscula) – implante de lamínula (letra minúscula), o grupo probiótico (I) difere do grupo controle e espirulina (I) e (SI). No décimo segundo dia para os mesmos fatores, apenas entre espirulina (SI) difere estatisticamente ($p < 0,05$) do probiótico (SI) e controle (I) e (SI), sendo o controle (I) diferente do probiótico e espirulina (I).

Os valores médios de CHCM oscilaram para as duas diferentes densidades sendo que os grupos suplementados com espirulina, independente na implantação de lamínula apresentaram queda bem acentuada no terceiro dia de coleta. No sétimo dia de coleta observa-se diminuição dos valores médios de CHCM e no décimo segundo dia um aumento acentuado dos valores em ambas as densidades.

Os valores médios dos índices hematimétricos como descrito na literatura, podem variar através da concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e número de eritrócitos (Er). Estas variações podem ser decorrentes do estresse do animal, do peso corporal, da sazonalidade e do sexo. Outros fatores também podem atuar na variação dos índices hematimétricos. AFFONSO *et al*, (2002) observou em *Colossoma macropomum* exposto a hipóxia, aumento do número de eritrócitos, hemoglobina e CHCM, segundo o mesmo autor, quando expostos a H₂S e hipóxia relata a diminuição do número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Diferentes espécies de peixes mantidas em água com o pH ácido, apresentaram aumento do hematócrito, concentração de hemoglobina, glicemia, número de eritrócitos, VCM, CHCM, leucócitos totais e percentual de trombócitos, neutrófilos e monócitos (RAMHHASKAR e SRINIVASA-RAO, 1989). No presente estudo, foram observadas que a interação entre as dietas e os

parâmetros hematológicos avaliados, mostra-se diferença estatística ($p < 0,05$) para VCM na dieta controle, embora as variações dos valores médios tivessem mantido diferenças entre os diferentes dias de coleta.

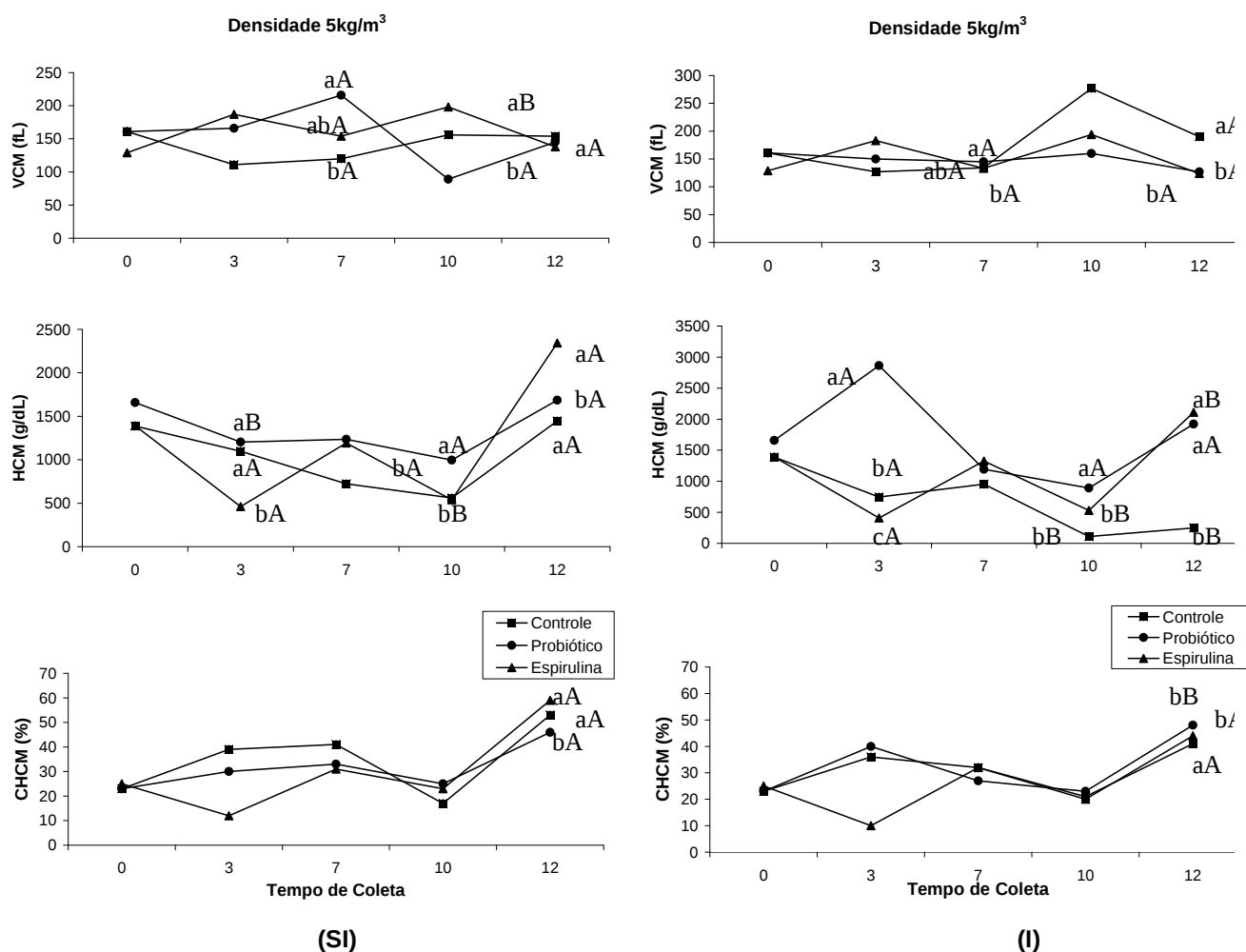


Figura 10- Variação dos índices hematimétricos utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 5kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média

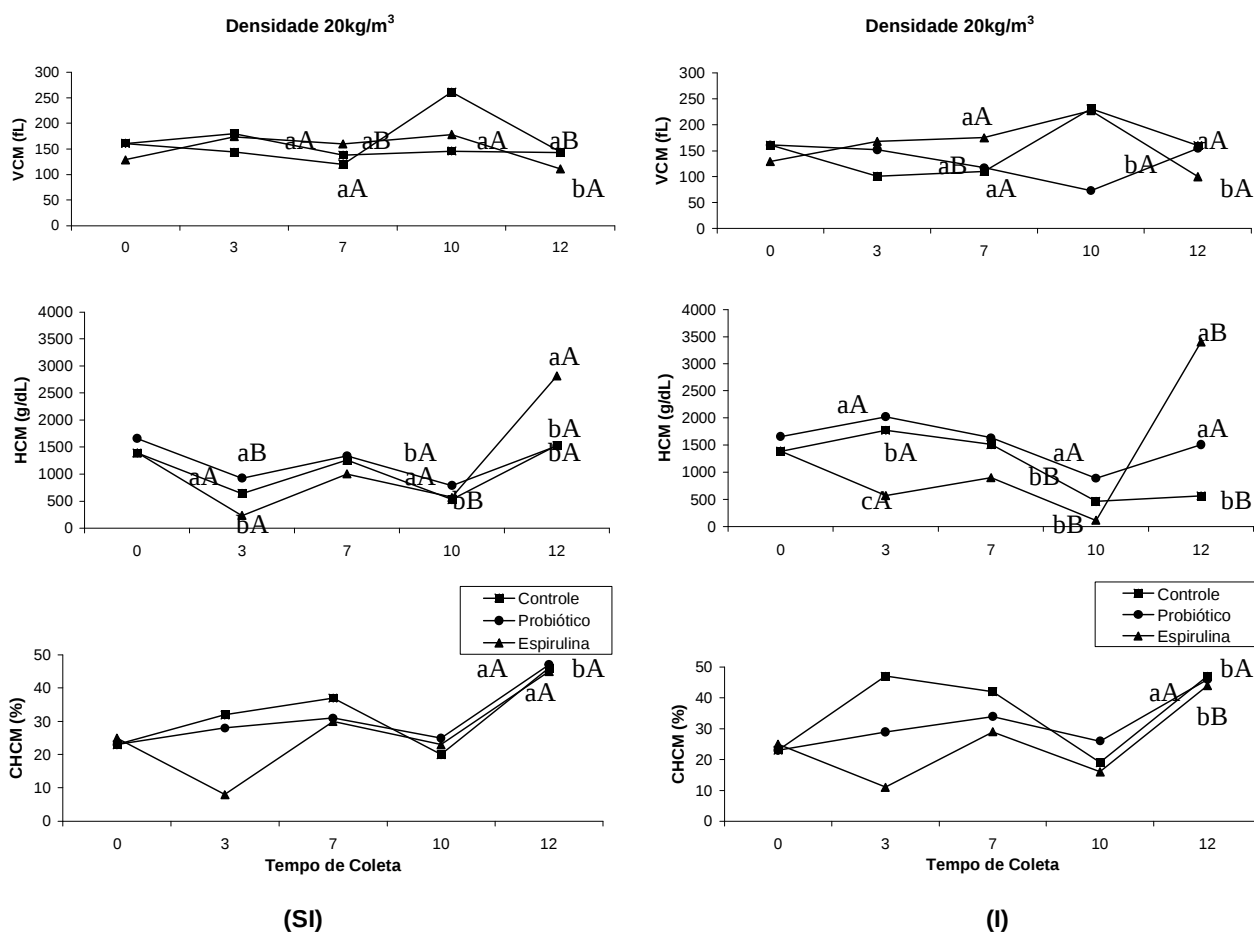


Figura 11- Variação dos índices hematimétricos utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 20kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média

Os valores de leucócitos totais (Lc) (Figuras 12 e 13) apresentaram oscilação para as duas densidades estudadas e ocorreram algumas diferenças estatísticas entre as médias de Lc para dieta, densidade, implante de lamínula e tempo de coleta (representados pelas diferentes letras maiúsculas e minúsculas)

De maneira geral o número absoluto dos diferentes leucócitos também oscilou ao longo do tempo, com diferenças estatísticas significativas entre as médias (indicado por diferentes letras maiúsculas e minúsculas nas figuras 12,13,14 e 15). O que fica bastante claro é que o aumento do número absoluto de leucócitos totais está relacionado

ao aumento do número absoluto de linfócitos (nos 7º. E 14º. Dias de coleta nos animais suplementados com espirulina) e de neutrófilos, principalmente no grupo controle.

Os valores médios de Monócitos (Mn) (Figuras 12 e 13) nas duas densidades 5 e 20 kg/m³ com (I) e (SI) mostraram, no decorrer do experimento, diminuição de seus valores, sendo mais acentuado no terceiro e décimo dia para todos os tratamentos, No décimo dia de coleta todos os tratamentos demonstraram um aumento gradativo de seus valores, sendo que na densidade de 20 kg/m³ estes aumentos foram mais acentuados. No sétimo dia de coleta ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) entre o fator dieta (letra maiúscula), a espirulina (I) que diferem de todos os tratamentos com (I) e (SI) exceto do probiótico (SI). Nos peixes com implante de lamínula (letra minúscula), os que foram suplementados com espirulina (I) diferiram dos suplementados com probiótico (I) e dos com espirulina SI. No décimo dia de coleta os suplementados com espirulina (I) diferiram estatisticamente de todos os tratamentos com (I) e (SI). Os peixes suplementados com espirulina (I) diferiram apenas do controle e probiótico (SI).

Os valores médios de eosinófilos (Eos) (Figura 14) no terceiro dia de coleta oscilaram, observando aumento dos valores na densidade de 5 kg/m³ com (I) e (SI), onde, apenas o tratamento controle 5 kg/m³ (I) obteve o menor valor. Na densidade de 20 kg/m³ no mesmo tempo de coleta os valores oscilaram, observando o menor valor para o tratamento com probiótico (I) e (SI) e espirulina (I). Apenas no sétimo dia de coleta na densidade de 5 kg/m³ (I), ocorre aumento dos valores médios de eosinófilos, sendo mais acentuados para o tratamento controle e probiótico. Não foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os fatores, densidade, dieta e implante de lamínula.

Os basófilos (Bs) (Figura 14) aparecem no terceiro dia de coleta apenas nos animais do tratamento controle, na densidade de 5 kg/m³ (SI) e probiótico 5 kg/m³ (I). Na densidade de 20 kg/m³ os basófilos aparecem no terceiro dia de coleta no grupo sem implante (SI) e no décimo segundo dia de coleta no grupo com implante (I).

As Células Granulocíticas Especiais (CGE) (Figura 14) demonstram no terceiro e sétimo dia de coleta nas duas densidades 5 e 20 kg/m³ com (I) e (SI) diminuição dos valores, aumentando no sétimo e décimo segundo dia de coleta, sendo neste último mais acentuado. O tratamento com probiótico na densidade de 5 kg/m³ (I) apresentou maiores valores em relação aos demais tratamentos com (I) e (SI), diminuindo no último dia de coleta. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) ocorre entre espirulina 5 kg/m³ com o probiótico 5 kg/m³ e controle 20 kg/m³ no terceiro dia de coleta para o fator dieta -

densidade, sendo o probiótico (SI) estatisticamente diferente ($p < 0,05$) dos outros tratamentos com (I) e (SI) no décimo dia de coleta para o fator implante de lamínula.

Os leucócitos usualmente observados na circulação dos peixes são os linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Sua principal função é a defesa do organismo contra a ação de bactérias ou corpos estranhos que penetram nos tecidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Os linfócitos produzem anticorpos e estão relacionados ao processo de rejeição e participam do processo inflamatório (FINN e NIELSON, 1971; MacARTHUR *et al.*, 1984; TURNER, 1988).

Os neutrófilos representam a primeira defesa contra infecções (TURNER, 1988) e possuem um sistema de agentes microbicidas. No presente trabalho, observa-se claramente esta relação entre as células de defesa do organismo entre os peixes do grupo com implante e sem implante no terceiro dia de coleta nas duas densidades. Os peixes implantados apresentam no terceiro dia de coleta aumento de neutrófilos e diminuição dos linfócitos devido ao início do processo infeccioso, provocado pelo implante das lamínulas de vidro no tecido subcutâneo dos peixes, corroborando com os autores. Após o início do processo infeccioso, nota-se o aumento dos linfócitos nas duas densidades com (I) e (SI) e a diminuição dos neutrófilos na densidade com (I) sendo acentuada e oscilando nas densidades sem implante.

Os eosinófilos apresentam a função de fagocitar e destruir complexos de antígenos com anticorpos, limitar e circunscrever o processo inflamatório, sendo as últimas a surgir durante o processo inflamatório (SUZUKI, 1986). No estudo observa-se a variação dos eosinófilos nos grupos com implante de lamínulas sendo mais elevado na densidade de 5 kg/m³. Os monócitos são células parcialmente diferenciadas, apresentam moderada atividade fagocítica, tornando-se macrófagos maduros nos tecidos (MATUSHIMA e MARIANO, 1996; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUSA, 2004), secretam moléculas que amplificam a resposta imune, controlam a inflamação e contribuem para o reparo dos danos teciduais por remoção do tecido morto. No estudo observa-se a ação dos monócitos sendo baixa nos primeiros dias de coleta, apresentando oscilações no sétimo e décimo dia de coleta, demonstrando neste último um leve aumento dos valores. Nas análises estatísticas realizadas, os valores médios do número total de Leucócitos e Trombócitos, sendo os neutrófilos as células de defesa que diferiram estatisticamente.

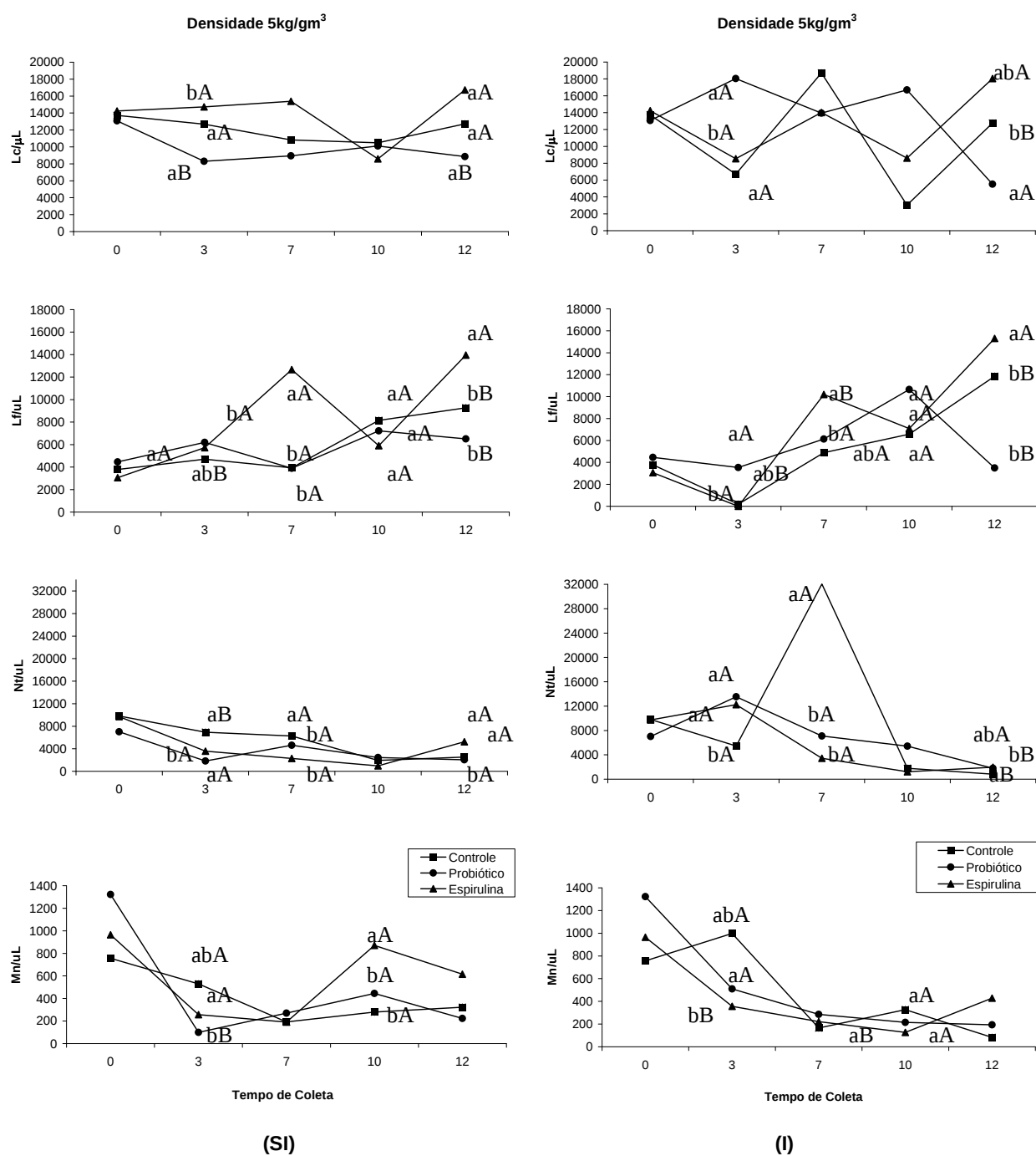


Figura 12a– Valores médios do número de leucócitos totais e absolutos dos diferentes leucócitos, em sangue periférico, de tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 5kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Lc = número de leucócitos totais; Lf = número absoluto de linfócitos; Nt = número absoluto de neutrófilos; Mn = número absoluto de monócitos

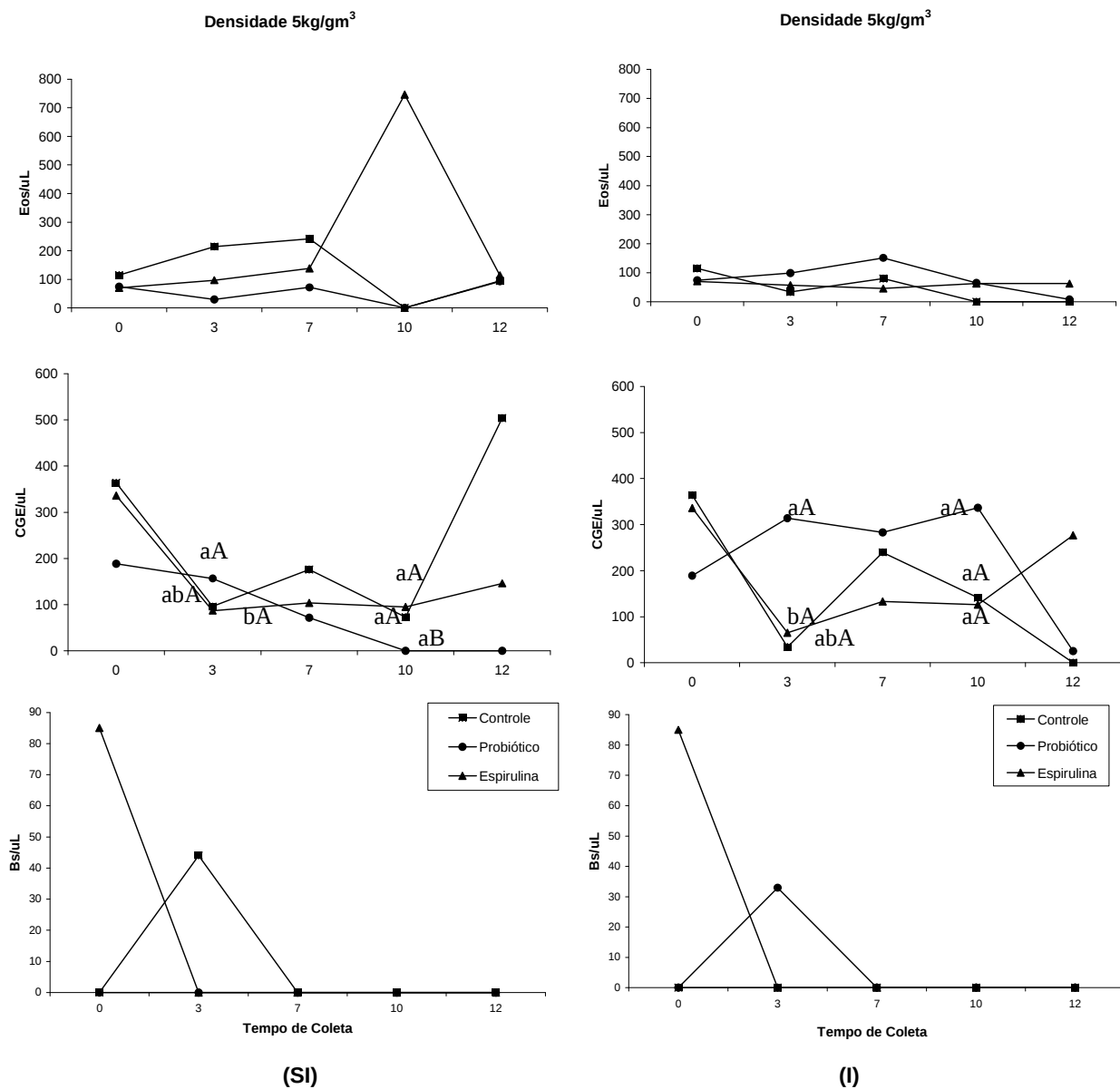


Figura 12b– Valores médios do número de leucócitos totais e absolutos dos diferentes leucócitos, em sangue periférico, de tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 5kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Eos = número absoluto de eosinófilos; CGE = número absoluto de células granulocíticas especiais; Bs = número absoluto de basófilos

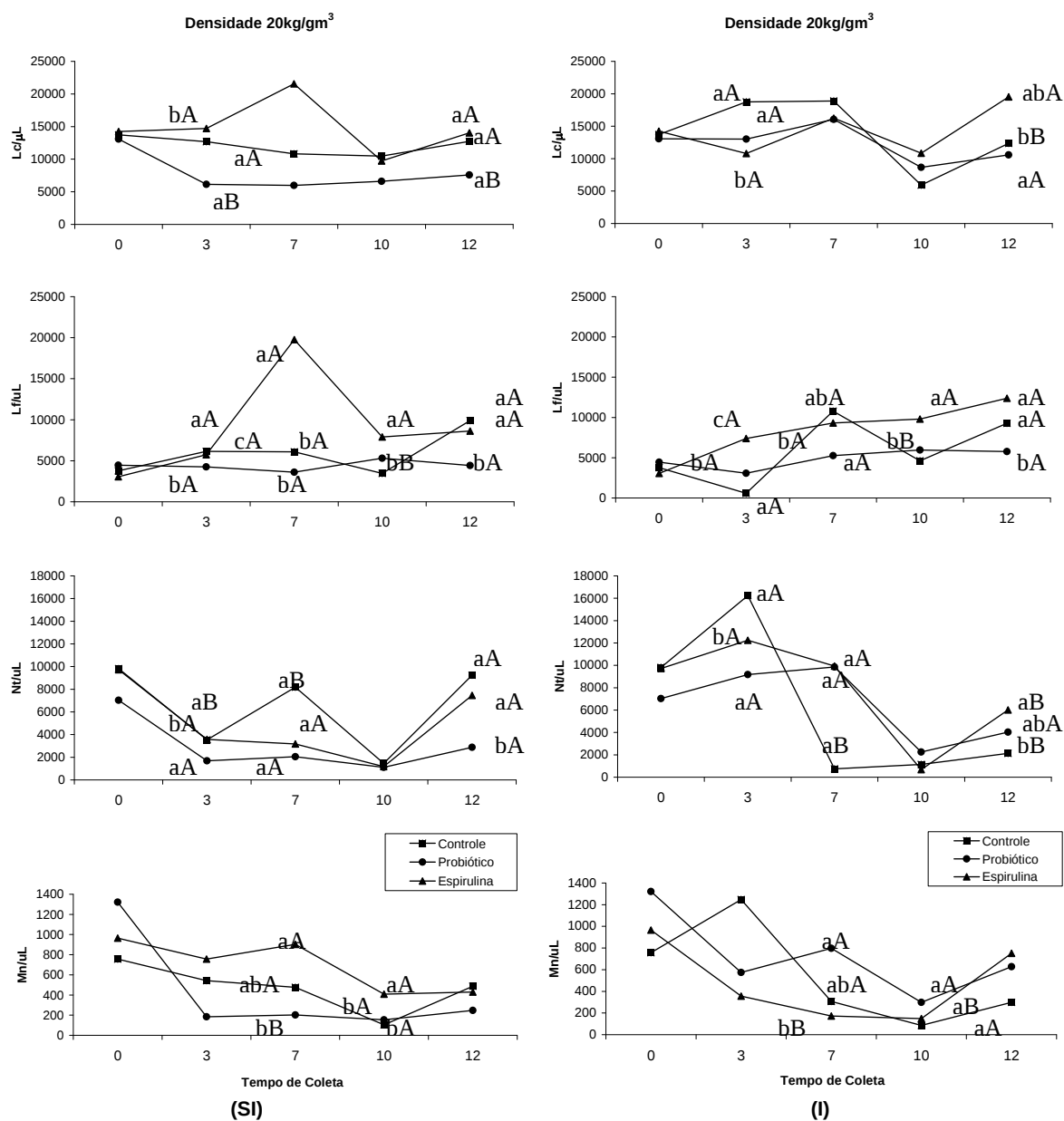


Figura 13a– Valores médios do número de leucócitos totais e absolutos dos diferentes leucócitos, em sangue periférico, de tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 5kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Lc = número de leucócitos totais; Lf = número absoluto de linfócitos; Nt = número absoluto de neutrófilos; Mn = número absoluto de monócitos

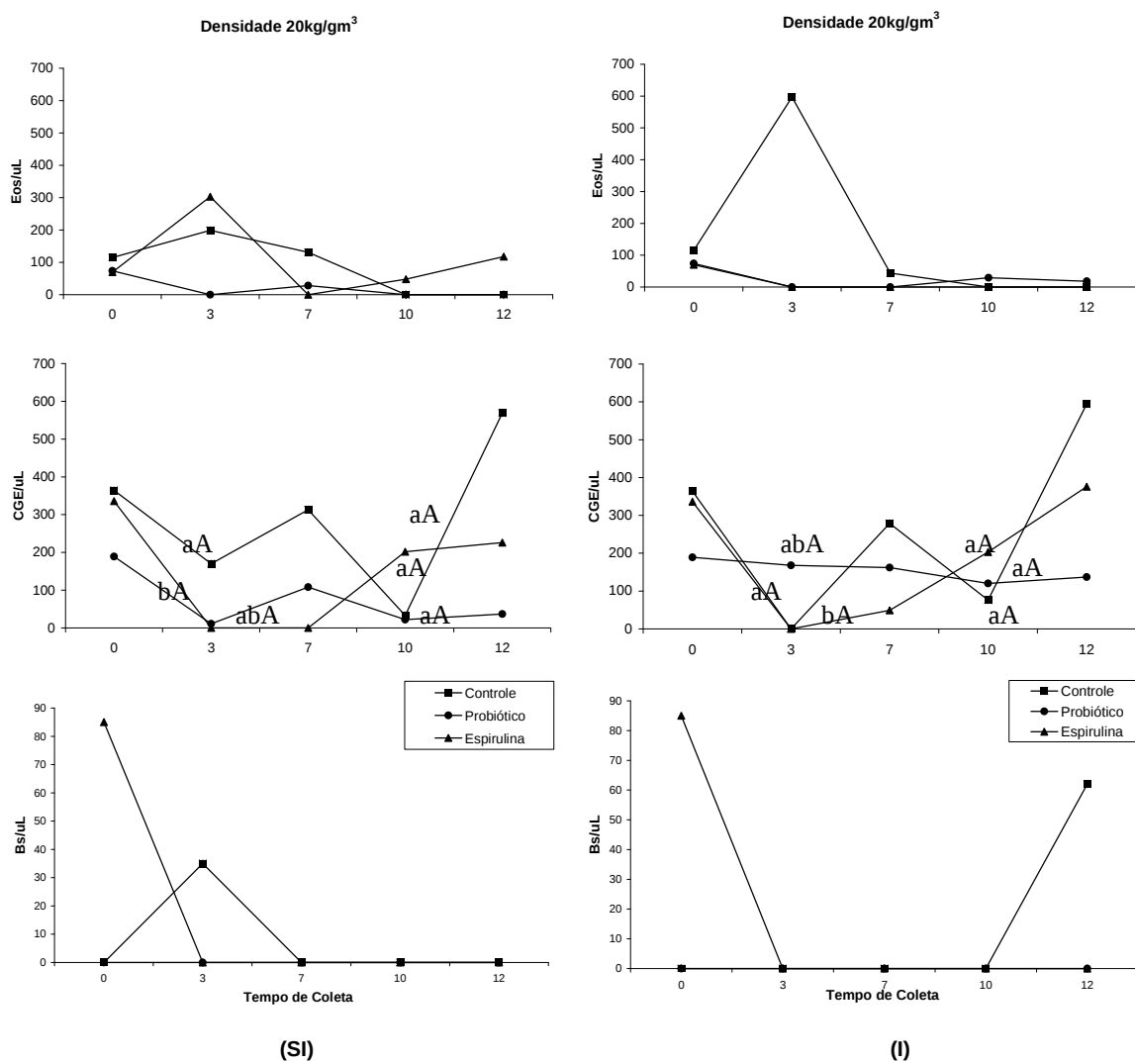


Figura 13b– Valores médios do número de leucócitos totais e absolutos dos diferentes leucócitos, em sangue periférico, de tambaqui *Colossoma macropomum* com densidade de estocagem 5kg/m³, alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina. SI = sem implante; I = com implante; Eos = número absoluto de eosinófilos; CGE = número absoluto de células granulocíticas especiais; Bs = número absoluto de basófilos

Os valores médios de trombócitos (Figura 15) diminuíram bruscamente no terceiro dia de coleta e apresentaram aumento gradual no sétimo e décimo segundo dia. No terceiro tempo de coleta no fator dieta, o controle (I) difere estatisticamente do controle (SI) do probiótico e espirulina com (I) e (SI). No fator implante, cada dieta diferiu entre si nas densidades 5 e 20 kg/m³ com implante e sem implante. No sétimo dia de coleta, a densidade de 20 kg/m³ (SI) difere estatisticamente das densidades 5 e 20 kg/m³ com (I) e (SI). Os valores dos peixes do tratamento controle na densidade de 20 kg/m³ diferiram estatisticamente dos tratamentos nas densidades de 5 e 20 kg/m³ no décimo dia de coleta. No fator densidade, a espirulina 20 kg/m³ difere das outras dietas nas densidades de 5 e 20 kg/m³.

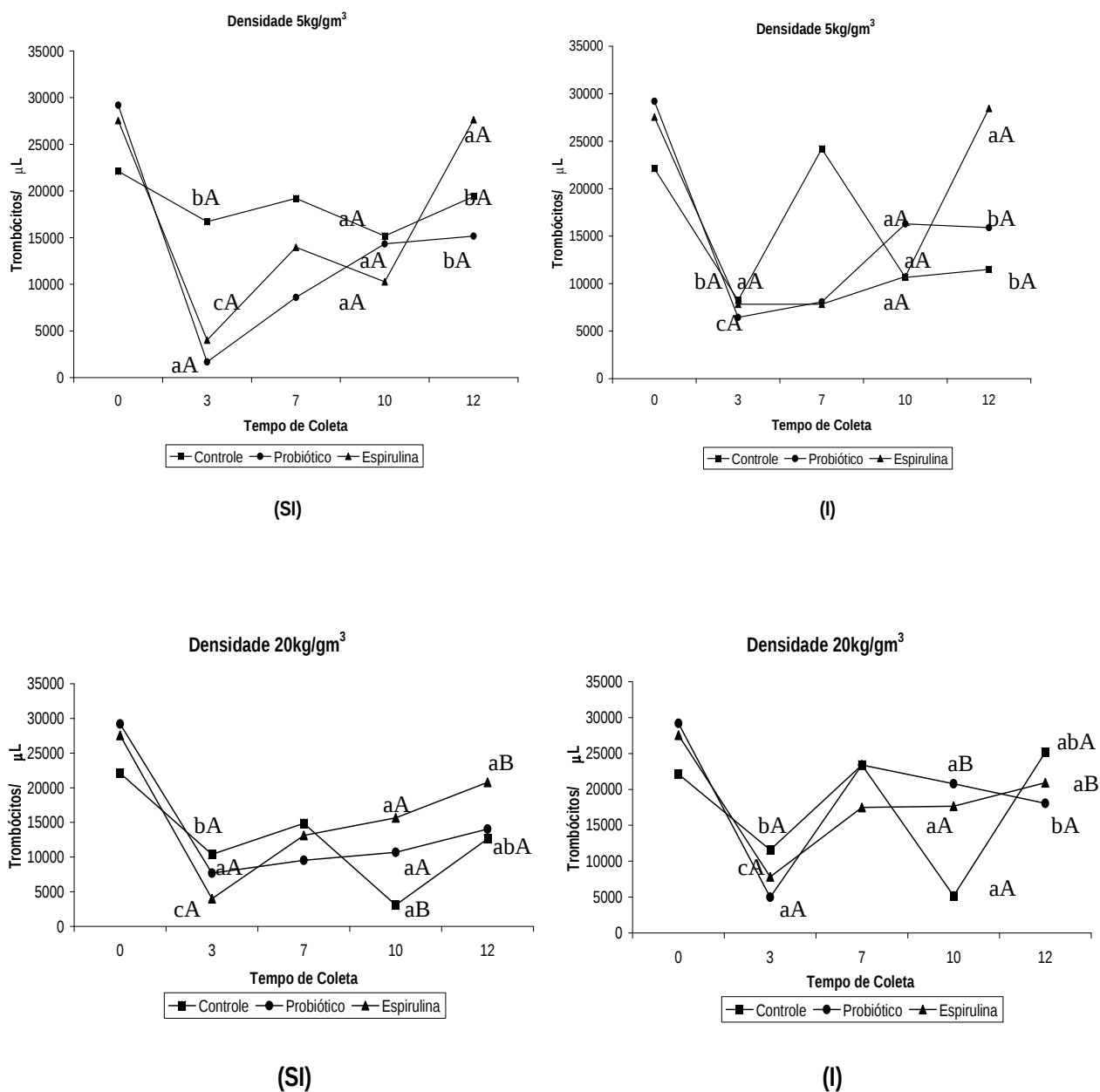


Figura 14– Valores médios da contagem total de trombócitos, em sangue periférico, utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina

Os trombócitos desempenham nos peixes um papel importante, não só da coagulação como também participam, segundo alguns autores, do processo de defesa dos organismos (MATUSHIMA e MARIANO, 1996). Em geral, há relação inversa

entre o percentual de trombócitos e de linfócitos, ou seja, o número de trombócitos aumenta quando o número de linfócitos diminui e vice-versa (TAVARES-DIAS *et al.* 2004). No presente estudo, esta relação inversa entre linfócito e trombócitos foi comparada apenas para os tratamentos sem implante de lamínulas nas duas densidades, pois, apresentaram aumento dos linfócitos no terceiro dia de coleta, sendo inverso para os tratamentos com implante de lamínula nas duas densidades. Estudos demonstram que os trombócitos circulantes apresentam meia-vida, para garantir a homeostasia e manter a capacidade de coagulação sanguínea (FISHER *et al.*, 1998). Salmonídeos submetidos ao estresse por população, apresentaram redução do número de trombócitos sem alterar o número de eritrócitos (PICKERING e POTTINGER, 1987). MATUSHIMA e MARIANO (1996) estudando a cinética celular em exsudado da bexiga natatória de *Oreochromis niloticus*, induzido pela carragenina, observaram que a migração de células para o órgão foi predominantemente de trombócitos. Devida a elevada decorrência de trombócitos no sangue circulante (MATUSHIMA e MARIANO, 1996.; CARDOSO, 2002) a presença de substâncias envolvidas na fagocitose como a fosfatase ácida e glicogênio (CARVALHO, 2002), sua presença em exsudado da inflamação, sua função como célula de defesa orgânica em diferentes espécies de vertebrados não mamíferos, incluindo os peixes é discutida.

Para os valores médios de Glicose (Figura 16) observa-se no terceiro dia de coleta aumento dos valores na densidade de 5 e 20 kg/m³ com (I), sendo que no mesmo dia de coleta na densidade de 5 e 20 kg/m³ (SI) os valores médios de glicose diminuiram. No décimo dia, os valores médios de glicose diminuem para todas as densidades com (I) e (SI), sendo observado um aumento dos valores médios para o tratamento 20 kg/m³ (SI). Na densidade de 5 e 20 kg/m³ (I), observa-se aumento dos valores médios de glicose no décimo segundo dia de coleta. No terceiro tempo de coleta as densidades 5 e 20 kg/m³ com (I) difere estatisticamente das densidades 5 e 20 kg/m³ (SI), sendo no fator implante a densidade de 5 kg/m³ (I) diferente de todos os tratamentos. O probiótico e o controle na densidade 20 kg/m³ difere estatisticamente ($p < 0,05$) do controle, probiótico e espirulina da densidade 5 kg/m³ no sétimo dia de coleta. No décimo segundo dia de coleta no fator dieta - densidade, o grupo controle na densidade 20 kg/m³ mostra diferença estatística ($p < 0,05$) entre todas as dietas na densidade de 5 e 20 kg/m³. No fator dieta - implante de lamínula, a espirulina (SI) difere estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos.

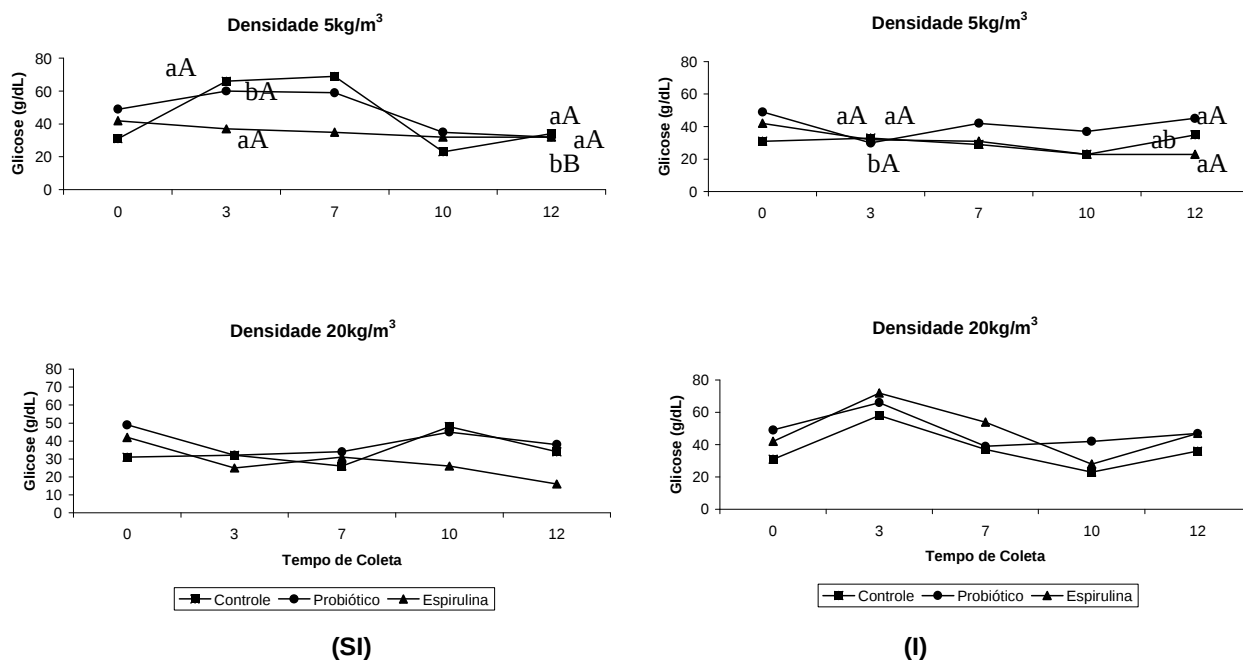


Figura 15 – Valores médios de glicose utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.

A glicemia é considerada um método valioso no diagnóstico da ocorrência de estresse fisiológico em peixes (WENDELAAR BONGA, 1997 e ACERETE *et al.*, 2004). Nos peixes estressados as alterações hematológicas, geralmente são acompanhadas de hiperglicemia (TAVARES-DIAS *et al.*, 2001 e URBINATI e CARNEIRO, 2001), decorrente da liberação aumentada de cortisol, que induz incremento da glicogênese hepática (MOMMSEN *et al.*, 1999). A elevação do cortisol durante um estímulo estressante, pode estimular a produção de glicose pelo aumento da glicogenólise, possivelmente pelo glucagon ou epinefrina (REID *et al.*, 1992; VIJAYAN *et al.*, 1993). Alterações imediatas nas concentrações plasmáticas de glicose, a glicogenólise, sugerem uma possível diminuição das reservas de glicogênio hepático pós - estresse, e talvez a importância da participação da insulina neste processo (VIJAYAN *et al.*, 1994). MORAES e GARCIA LEME (1982) comentam que a participação hormonal no controle da reação inflamatória ocorre pelo antagonismo fisiológico existente entre os corticosteróides adrenais e a insulina. O cortisol na sua

hipersecreção em decorrência do estresse deprime mecanismos de defesa orgânica, como a inflamação, tornando os animais mais susceptíveis às enfermidades.

No presente estudo, os altos valores de glicose demonstram somente para os peixes submetidos ao implante de lamínula de vidro no tecido subcutâneo no terceiro dia de coleta, indicando a inflamação como agente estressor. BELO (2002) e BRUM (2003) observaram que em peixes submetidos à alta densidade populacional sofreram aumento da secreção de cortisol e inibição do acúmulo de macrófagos e da formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo. Entretanto, no presente estudo o aumento da agregação celular para as lamínulas e os baixos níveis de glicose, ocorreram entre o sétimo e décimo segundo dia de coleta, sendo no último dia, observado um leve aumento nos valores de glicose.

No efeito da dieta, a espirulina na densidade de 5 kg/m^3 no sétimo dia de coleta, mostra os baixos valores de glicose, em contrapartida, maior número de células agregadas nas lamínulas. Quanto maior a concentração do cortisol, menor a migração e formação de células policariontes nas lamínulas, o fato é que o estresse deprime o mecanismo de defesa dos peixes (BELO *et al.*, 2005). MORAES e GARCIA LEME (1982) comentam que os corticosteroides, através de um mecanismo dependente da ocupação de receptores e da síntese de lipocortina, inibem a atividade da fosfolipase A2, bloqueando a síntese de eicosanóides e do fator ativador de plaquetas a liberação de citocinas pro-inflamatórias por macrófagos como a interleucina -1 e a adesão de leucócitos ao endotélio vascular inibindo sua migração (DINARELLO, 1984). Desse modo inibem a formação de edema e a migração de leucócitos para o foco inflamatório, entre eles os macrófagos, cuja fusão dá origem aos gigantócitos.

Observa-se na figura 16, que os números médios de macrófagos no tratamento com probiótico aumentaram no terceiro, décimo e décimo segundo dia de coleta, nas duas densidades de estocagem. Estatisticamente ocorreu diferença para o tratamento com probiótico em relação às demais dietas em relação ao número médio de macrófagos. BRUM (2003) comenta que com o decorrer do tempo houve alteração na característica das células, com diminuição do número de macrófagos com apenas um núcleo devido o surgimento de células com dois núcleos, com também observado no presente estudo.

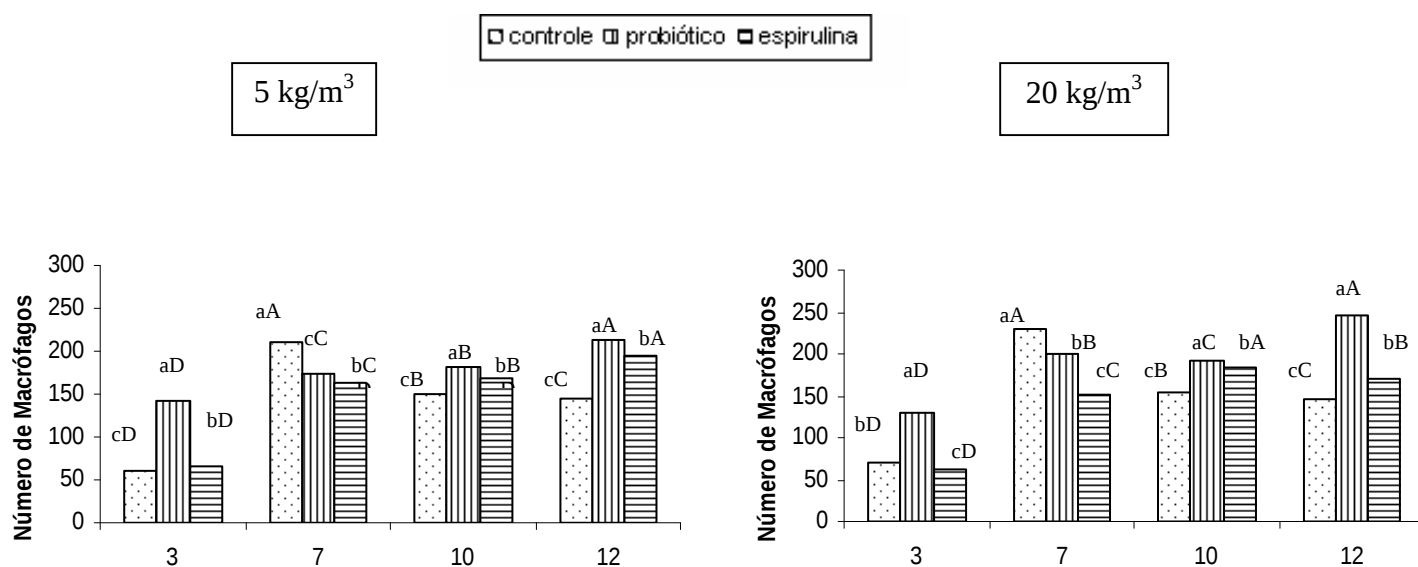


Figura 16 – Valores médios do número de macrófagos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.

Na figura 17, observa-se em todos os tratamentos menor acúmulo do número de células com dois núcleos na densidade de 20 kg/m³ comparado com a densidade de 5 kg/m³. Observado-se também maior número de célula no tratamento com probiótico na densidade de 5 kg/m³, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do tratamento com espirulina.

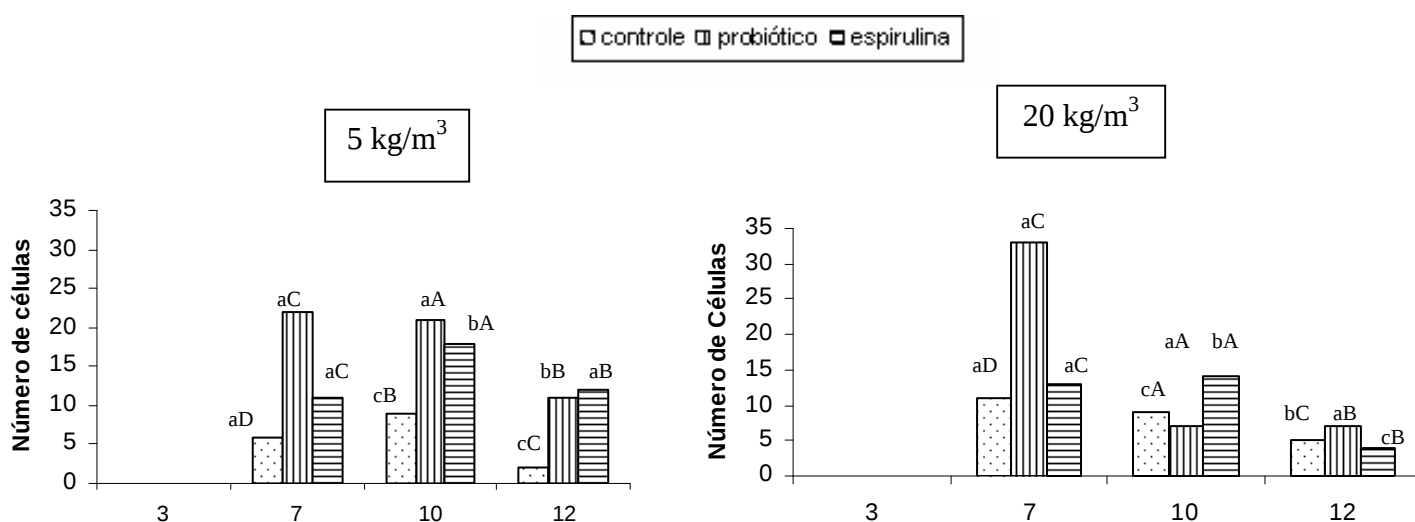


Figura 17 – Valores médios do número de células com dois núcleos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.

Os números de células com três a cinco núcleos de acordo com a figura 18, foi maior na densidade de 5 kg/m³ no tratamento com probiótico, ocorrendo oscilações na densidade com 20 kg/m³. Estatisticamente ocorreu diferença ($p < 0,05$) no tratamento com probiótico em relação ao tratamento com espirulina no décimo e décimo segundo dia de coleta.

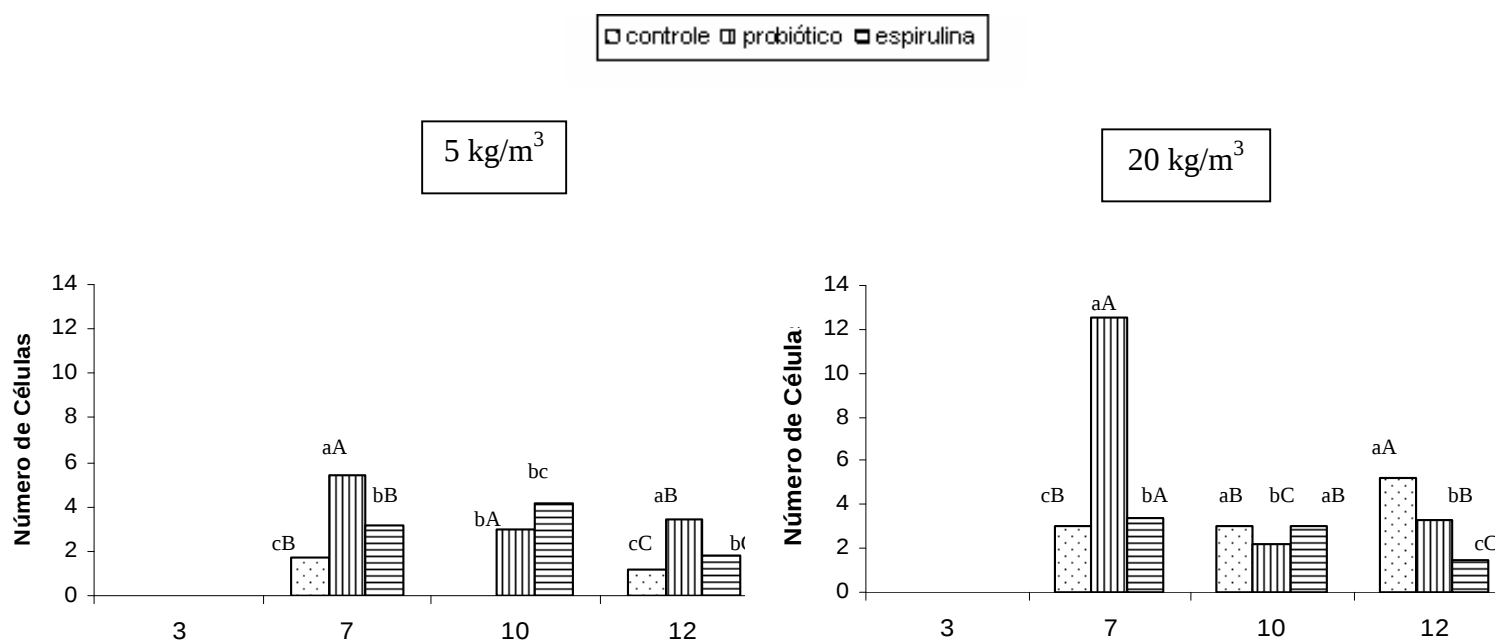


Figura 18– Valores médios do número de células com três a cinco núcleos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.

Na figura 19 nota-se maior acúmulo do número de células com seis a dez núcleos no tratamento com probiótico na densidade de 5 e 20 kg/m³, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos.

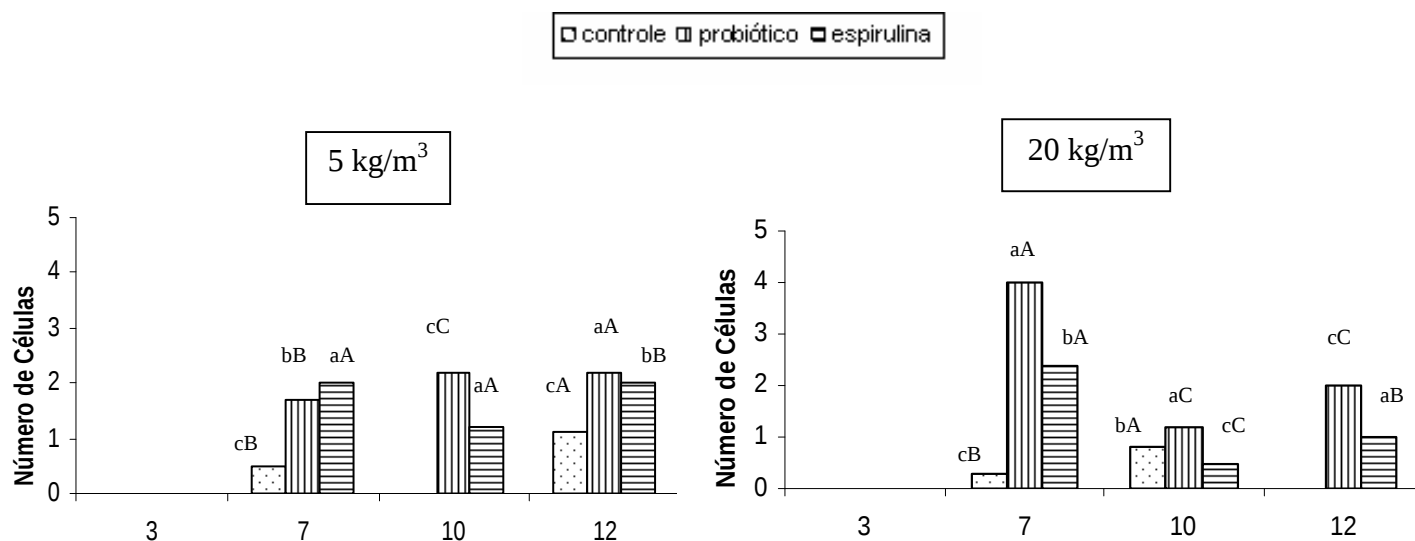


Figura 19 – Valores médios do número de células com seis a dez núcleos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.

Na figura 20, os valores médios do número de células com onze a vinte núcleos na densidade de 5 kg/m³ foram maiores para o tratamento com espirulina,. Na densidade de 20 kg/m³ observa-se aumento dos valores médios do número de células no tratamento com probiótico. O mesmo foi evidenciado na figura 21, para os valores médios do número de células com mais de vinte núcleos.

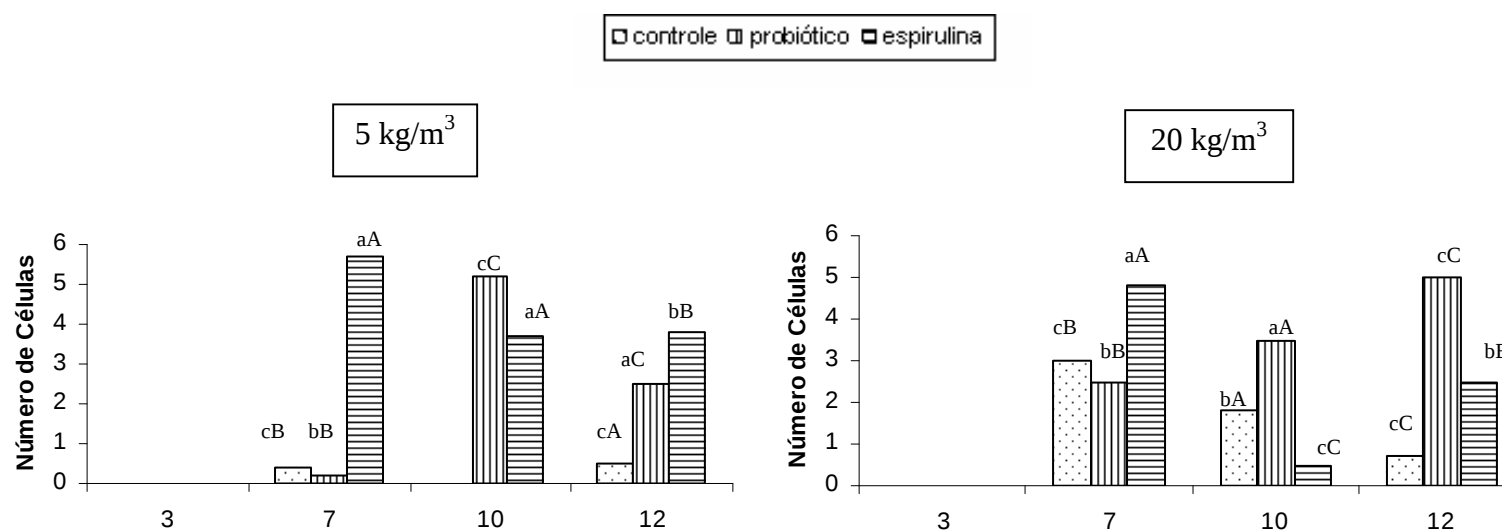


Figura 20 – Valores médios do número de células com onze a vinte núcleos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.

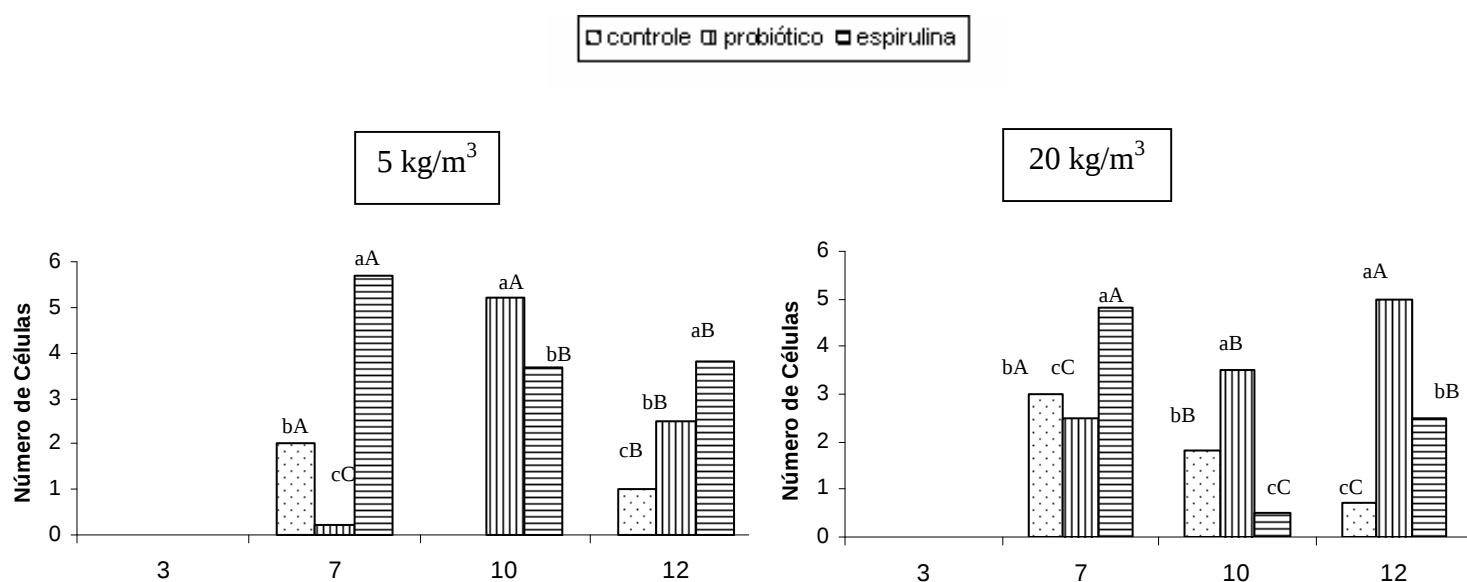


Figura 21 – Valores médios do número de células com mais de vinte núcleos em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.

Observando os valores médios do número de células de Langhans na figura 22, verifica-se que os peixes do tratamento com espirulina apresentaram maior acúmulo de células nas densidades de 5 e 20 kg/m³. Estatisticamente ocorreu diferença ($p < 0,05$) entre o tratamento controle e as demais dietas.

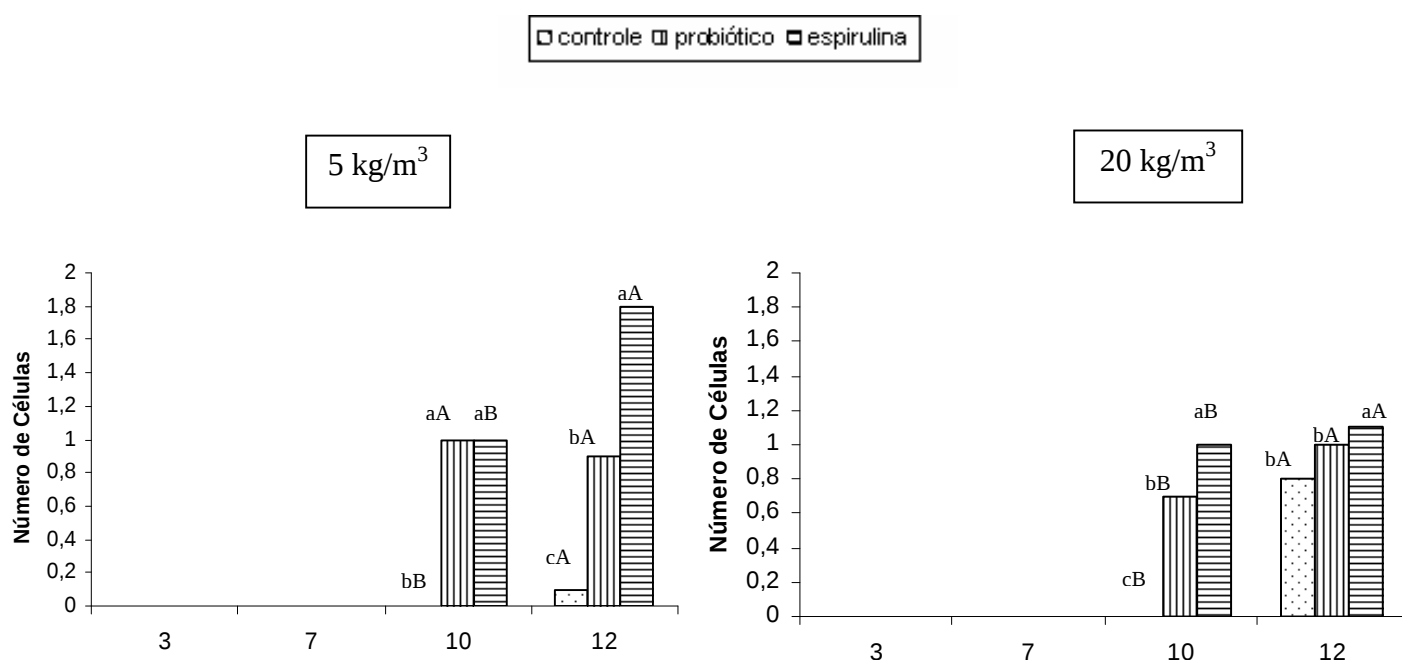


Figura 22 – Valores médios do número de células de Langhans em diferentes tempos de coleta após o implante das lamínulas, utilizados no experimento com tambaqui *Colossoma macropomum* com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.

A formação de células gigantes depende do recrutamento diário de macrófagos originários da transformação morfofisiológica de monócitos da corrente sanguínea (MARIANO e SPECTOR, 1974) para o foco inflamatório (BIRMAN e MARIANO, 1985). Uma vez no foco inflamatório os macrófagos fundem suas membranas para formar as células gigantes (MARIANO e SPECTOR, 1974). Inicialmente formam-se os gigantócitos do tipo corpo estranho cujos núcleos apresentam distribuídos

aleatoriamente pelo citoplasma, depois evolui gradativamente para o tipo Langhans em que os núcleos estão dispostos na periferia da célula (MARIANO e SPECTOR, 1974). Estes trabalhos corroboram com as observações feitas por PETRIC, 2000; BELO, 2002; BRUM, 2003 e SAKABE, 2007.

No presente estudo, observou a cinética do acúmulo de macrófagos no terceiro dia de coleta, evidenciando a dispersão de macrófagos por toda a lamínula e gigantócitos com dois núcleos a partir do sétimo dia de coleta. Os resultados demonstraram que após o implante das lamínulas ocorre o acúmulo de macrófagos e aumento progressivo do número de gigantócitos até o décimo segundo dia de coleta, sendo nos últimos dias de coleta evoluindo para células tipo Langhans.

O recrutamento de macrófagos, formação de células de gigantes e todo seu processo de maturação, com acúmulo de vários macrófagos e a transformação de células gigantes tipo corpo estranho em células de Langhans, refletem o bom desempenho de reação inflamatória mediante a experimentos com suplementação alimentar (SAKABE, 2007). Foram observados maiores números de macrófagos e células tipo corpo estranho para os peixes alimentados com a dieta contendo probiótico nas densidades de 5 e 20 kg/m³ nos diferentes tempos de coleta e células tipo Langhans para os peixes alimentados com a dieta contendo espirulina nas densidades de 5 e 20 kg/m³ nos dois últimos dia de coleta. PETRIC (2000) avaliando a suplementação com vitamina C sobre a formação de gigantócitos, comenta que os resultados das maiores doses de vitamina C (200 e 500 mg/kg) favoreceram maior recrutamento de macrófagos, promovendo o aumento do número de núcleos e conseqüentemente, aumento do tamanho dos gigantócitos, sendo o mesmo observado por BRUM (2003), em peixes alimentados com rações suplementadas com vitamina C. BELO (2002) observou em pacus submetidos à dieta contendo 450 mg de vitamina E /kg, aumento da formação de células gigantes policariontes.

A evolução do processo inflamatório em função do tempo de coleta, apresenta aumento crescente e significativo entre os dias de coleta empregados no experimento para as contagens de células nas lamínulas, corroborando aos achados por PETRIC *et al.* (2003) e BELO (2006). Foi constatado o pico de gigantócitos com dois núcleos e de três a cinco núcleos no sétimo dia de coleta e o decréscimo dos mesmos nas coletas seguintes até o final do experimento. SAKABE (2007) relata que no sexto dia de coleta pode-se observar uma estabilização do número de macrófagos e gigantócitos de dois núcleos quando comparados às lamínulas do quarto dia. As contagens das lamínulas com gigantócitos de onze a vinte núcleos e com mais de vinte núcleos, mantiveram-se

em níveis altos, observados entre o sétimo ao décimo segundo dia de coleta entre as densidades de 5 e 20 kg/m³ para as dietas com espirulina e probiótico, sendo o probiótico com valores mais altos. SAKABE (2007) comenta que no sexto dia de coleta gigantócitos com número maior de células (três a cinco, seis a dez e 11 a 20) apresentou porcentagens dessas células maiores do que as coletas anteriores. O mesmo foi observado no presente estudo, evidenciando os surgimento destas células no sétimo dia de coleta. O experimento com dietas contendo probiótico e espirulina constatou que o modelo experimental utilizado por meio do implante de lamínula no tecido subcutâneo de tambaqui é adequado para a avaliação da cinética com formação de macrófagos poliariontes, pois foi constatada a evolução de formação dos gigantócitos no decorrer do experimento, corroborando com os trabalhos de PETRIC, 2000; BELO, 2002; BRUM, 2003 e SAKABE, 2007.

Os resultados apresentados neste trabalho com diferentes densidades de estocagem e alimentados com dietas contendo probiótico e espirulina, revelam que os peixes alimentados com a dieta contendo probiótico apresentaram melhores respostas ao processo inflamatório. Ocorreu também melhor recuperação quanto à lesão causada pelo implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo dos tambaquis, promovendo maior índice de sobrevivência dos mesmos, comparado com as outras dietas testadas. As análises hematológicas não apresentaram nenhuma relação quanto às dietas testadas e as densidades empregadas, não havendo diferenças entre elas ao longo do experimento.

6 CONCLUSÃO

- I. Conclui-se que a suplementação da dieta de tambaqui com probiótico e espirulina não causa alterações nos valores hematológicos e de glicose.
- II. A formação de célula gigante também foi influenciada pela suplementação com probiótico.
- III. Ocorreu maior crescimento e sobrevivência nos peixes suplementados com dieta contendo probiótico, como também melhor resposta ao processo de cicatrização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATTAH, M. 1999. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Aquaculture* 179:149 – 168.
- ACERETE. L.; BALASCH. J.C.; ESPINOSA. E.; JOSA. A. e TORT. L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*. 237: 167 – 178.
- AFFONSO, E.G., POLEZ, V.L.P. CORRÊA, C.F., MAZON, A.F., ARAÚJO, M.R.R.; MORAES, G., RANTIN, F.T. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133: 375–382.
- ALEXANDER, J.B. e INGRAM, G. A. 1992. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2: 249 – 279.
- ALVARADO, C.E.G. 2003. Treinamento alimentar de Pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829): sobrevivência, crescimento e aspectos econômicos. Dissertação de mestrado, Centro de aquíicultura da UNESP/Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 72pp.
- AUSTIN, B. 1998. Biotechnology and diagnosis and control of fish pathogens. *J. Mar. Biotechnol.*, 6: 1 – 2.
- ÁVILA, F.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P; QUINTANA, J. L; BASSO, A; AMBROSIM, J. A. 1998. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Belo Horizonte, v.50, n.5, p.505-511.
- BARCELLOSA, L. J. G.; KREUTZA, L. C.; SOUZAA, C.; RODRIGUESA, L. B.; FIOREZEB, I.; QUEVEDOB, R. M.; CERICATO, L.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L. A. 2004. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture* 237: 229–236.
- BELO, M. A. A. 2002. Efeito do estresse por superpopulação e suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. Dissertação de Mestrado em Patologia Animal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCV-UNESP), Jaboticabal. 76p.

- BELO, M. A. A. 2006. Recrutamento de macrófago e formação de gigantócitos em *Oreochromis niloticus*, submetidas a diferentes estímulos moduladores. Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, Jaboticabal (Tese de Doutorado), 146p.
- BIRMAN, E. G.; MARIANO, M. 1985. The influence of inflammatory agents on giant cell formation. *Brazilian Journal of Biological Research*. 18: 507 – 512.
- BOYD, C.E.; QUEIROZ, J.F. 2004. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. In: Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt, 533p.
- BOROWITZKA, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70: 313 – 321
- BLY, J. E. e CLEM, L. W. 1992. Temperature and teleost immune functions. *Fish and Shellfish Immunol.*, 2: 159 – 171.
- BRITTON, G.; ARMITT, G. M. ; LAU, S. Y. M. ; PATEL, A. K. e SHONE, C. C. 1981. Carotenoproteins. in: *Carotenoid Chemistry & Biochemistry* (Ed. By G. BRITTON and T. W. GOODWIN), Pergamon Press, Oxford. 237 – 251.
- BRUM, C. D. 2003. A vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em pacu, *Piaractus mesopotamicus* estressados por alta densidade. Dissertação de Mestrado. Centro de Aquicultura da Unesp. Jaboticabal. 51p.
- CAPRETZ, A.L.A. 2000. Considerações sobre a espirulina na alimentação das aves. *Revista Pássaros*, 22.
- CARDOSO, A. L. P. 2002. Estudo hematológico em aves inoculadas com *Salmonella gallinarum*. Dissertação (Especialização Lato Sensu – área de concentração – imunologia Básica e Aplicada). Centro Universitário Barão de Mauá, Riberão Preto. 88p.
- CARVALHO, V. A. 2002. Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sanguíneos e ultra-estruturais de trombócitos e granulócitos do surubim cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) Osteichthyes, Siluriformes. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 101p.
- COLLIER, H.B. 1944. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Can. Med. Ass. J.*, 50: 550-2.
- COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. 1998. Selection of probiotics strains for human applications *Int. Dairy J. Amsterdam, Amsterdam*, v. 8, p.487-490
- CONTRERAS A., HERBERT D.C., GRUBBS B.G., CAMERON I.L. 1979. Blue-green alga, spirulina, as the sole dietary source of protein in sexually maturing rats. *Nutr. Rep. Int.*, 19:749-63.

- COPPOLA, M .M.; GIL-TURNES, C. 2004. Efeito de probiótico na resposta imune Ciência Rural, Santa Maria, v. 34, n. 4, p.1297-1303.
- CORRÊA, G.S.S.; GOMES, A. V.C.; CORRÊA, A.B.; SALLES, A.S. e MATTOS, E.S. 2003. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 4 (55):12-17.
- CHOUBERT, G. 1979. Tentative utilization of spirulin algae as a source of carotenoid pigments for rainbow trout. Aquaculture. 18: 135-143.
- CROSS, M.L. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiótico lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. Immunol. Medic. Microbiol., Amsterdam, v. 34, n. 4, p.245-253.
- DAS, P. C.; AYYAPPAN, S. e JENA, J. K. 2006. Haematological changes in the three indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. Aquaculture, 256: 80 – 87.
- DINARELLO, C. A. 1984. Interleukin -1 and the pathogenesis of the acute phase response. New Engl. J. Med., 311: 1413 – 1418.
- ENAME, N.A.; FRENKEL, K.; O’CONNOR, J.M.; SQUIBB, K.S. e ZELIKOFF, J.T. 1993. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. Immunology, 82: 68-72.
- FAO. Food Agriculture Organization of the United Nations, 2006. Fisheries department trends in global aquaculture production. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/statist/statist.asp>. Consultado em agosto de 2008.
- FINN, J.P. e NIELSON, N.O. 1971. The inflammatory response of rainbow trout. J. Fish Biol., London (3): 463-478.
- FISHER, U.; OTOTAKE, M. e NAKANISHI, T. 1998. Life span of circulating blood cells in ginbuna Crucian carp (*Carassius auratus*). Fish & Shellfish Immunol. 8: 589-606.
- FOX, S. 1988. Probiotics: Intestinal inoculants for produccion animals. Vet. Méd., 806-823.
- FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals: A review. J. Appl. Bacteriol., Oxford, 66, p. 365-378.
- FREITAS, C.E.C.; NASCIMENTO, F.A. e SOUZA, F.K.S. 2007. Levantamento do estado de exploração dos estoques de curimatã, jaraqui, surubim e tambaqui. In: Setor Pesqueiro na Amazônia – Situação Atual e Tendências. Ibama/AM, ProVázea. p. 120.
- FRITSCH, J.; DAROS, R.P. 2003. Projeto Político - Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca Brasília, maio/ 2003.
- FRISCHKNECHT, H .H.; WAHLI, T. e MEIER, W. 1994. Comparison of pathological changes due to deficiency of vitamin C, vitamin E and combinations of vitamins C

- and E in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of fish Diseases. Tarrytown. 17 (1): 31-45.
- FUJIMOTO, R.Y. 2004. Suplementação alimentar com cromo para pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 mantidos em duas densidades de estocagem. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura da Unesp. Jaboticabal, 132 p.
- FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals. A review. J. Appl. Bacteriology, 66: 365-378.
- FURST, P.T. 1978. Spirulina a nutritious alga, once a staple of Aztec diet, could feed many of the world hungry people. Human Nature, 3: 60.
- GARCIA, F. 2005. Pacus *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e E e submetidos ao desafio com *Aeromonas hydrophila*. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, 76 p.
- GATESOUBE, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 180: 147 – 165.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROUSIUS, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. American Journal Clinical Pathology, Philadelphia, 56 (1): 59-9.
- GOULDING, M. 1996 Pescarias Amazônicas, Proteção de Habitats e Fazendas nas Várzeas: Uma Visão Ecológica e Econômica. Workshop: Projeto de Manejo dos Recursos Aquáticos, Belém, PA, 26 a 28 de março, 35p.
- GOODWIN, A.E. e GRIZZLE, J.M. 1991. Granulomatous inflammation and monstrous giant cells in response to intraperitoneal hormone implants in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Journal Comparative Pathology, 104 : 148-160.
- GRAEF, A. e MONDARDO, M. 2006. Influência do probiótico no crescimento das carpas comum (*Cyprinus carpio*, 1758) na fase de recria. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. VII (11): 1-8.
- GRINSTEAD, G.S.; TOKACH, M.D. DRITZ. S.S.; GOODBAND. R.D.; NELSEN, J.L. 2000. Effects of Spirulina platensis on growth performance of weanling pigs. Animal Feed Science and Technology. 83:237-247.
- HOUSTON. A. H.; ROBERTS. W. C. e KENNINGTON. J. A. 1996. Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish. *Carassius auratus* L. Fish Physiol. Biochem. 15(6): 481-489.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2008. Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação/ Brasília: Ibama, 174.
- IGFA 2001. Internacional Game Fish Association. Database of IGFA angling records until 2001. IGFA, Fort Lauderdale, USA. <http://www.igfa.org/records.asp>

- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. 2004. *Histologia básica*. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 433p.
- KAVAMOTO, E.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. e TOKUMARU, M. 1983. Estudos hematológicos em “bagre” *Rhamdia hilarii* (Val. 1840), Teleósteo, no estágio de desenvolvimento gonadal maduro. Boletim do Instituto de Pesca, 10 (único): 53 – 60.
- KAY, R.A. 1991. Microalgae as food and supplement. Food Science Nutrition; 30: 555-573.
- KUMAR, R.; MUKHERJEE, S. C.; PRASAD, K. P. e PAL, A. K. 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). Aquaculture Research. 37, 1215 – 1221.
- KUMAR R.; MUKHERJEE S. C.; RANJAN, R. e KAYAK, S. K. 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. Fish & Shellfish Immunology, 24, 168-172.
- LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. 1999. Handbook of probiotics. New York: Wiley, 1999, 211p.
- LORENZ, R. T. 1999. A review of spirulina as a carotenoid and vitamin source for cultured shrimp. Spirulina Pacifica Technical Bulletin. 50.1-4.
- LOVSHIN, L.L. 1995. The colossomids. In C.E. Nash and A.J. Novotny (eds.) *World animal science: production of aquatic animals: fishes*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands. p. 153-159.
- LU, J., TAKEUCHI, T., OGAWA, H. 2003. Flesh quality of tilapia *Oreochromis niloticus* fed solely on raw Spirulina. Fish. Sci. 72, 529–534.
- LU, J.; TAKEUCHI. T. 2004. Spawning and egg quality of the tilapia *Oreochromis niloticus* fed solely on raw Spirulina throughout three generations. Aquaculture 234: 625–640.
- MACHACEK, H. (ed) 2007. World Records Freshwater Fishing. <http://www.fishing-worldrecords.com> consultado em 03 agosto de 2008.
- MARIANO, M. e SPECTOR, W. G. 1973. The formation and properties of macrophages polikaryons. Journal of Pathology, 113: 1-19.
- MARTINS, M.L. 2000. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus Holmberg*, 1887 estressados. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Unesp, Jaboticabal, SP, 123 p.
- MATUSHIMA. E. R. e MARIANO. M. 1996. Kinetics of inflammatory reaction induced by carregenin in the swim bladder of *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia). Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 33:5-10.
- MacARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.I.S.; DAVIDSON, R.J.L.; THOMSON, A.W. 1984. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. J. Fish Biol., London, 25 (1): 69-81.

- MELINGEM, G.O.; PETTERSEM, E.F.; WERGELAND, H.I. 2002. Leucocyte populatios and responses to immunization and photoperiod manipulation in Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) smolt. *Aquaculture*, 214: 381-396.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M.M.; MAUERWERK, V.L.; FRECCIA, A. 2006. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias-do-Nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35 (5): 1881-1886.
- MICHELAN, A.C.; SCAPINELLO, C.; NATALI, M.R.M.; FURLAN, A.C.; SAKAGUTI, E.S.; FARIA, H.G.; SANTOLIN, M.L.R.; HERNANDES, A.B. 2002. Utilização de probiótico, ácido orgânico e antibiótico em dietas para coelhos em crescimento: ensaio de digestibilidade, avaliação da morfometria intestinal e desempenho. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(6): 2227-2237.
- MMA/ IBAMA/ CEPENE 2003. Estatística da Pesca - Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Tamandaré: Abril, 96p.
- MORAES, F. R. e GARCIA LEME, J. 1982. Endogenous corticosteroids and insulin in the acute inflammation. *Microvasc. Res.*, 23: 281 – 293.
- MORIARTY, D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351 – 358.
- NAKAGAWA, H. 1997. Effect of dietary algae on improvement of lipid metabolism in fish. *Biomed e Pharmacother*, 51: 345-348.
- NANDEESHA, M. C.; GANGADHARA, B.; MANISSERY, J. K. e VENKATARAMAN, L. V. 2001. Growth performance of two indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of spirulina platensis. *Bioresource Technology*, 80: 117-120.
- NATT, M.P. e HENRRICK, C.A. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of chicken. *Poultry Sci.*, Ontário, 31 (1): 735-38.
- NIKINMAA, M.; SOVIO, A.; NAKARI, T. e LINDGREN, S. 1983. Handling stress in brown trout (*Salmo trutta*): physiological responses to transport in fresh water. And recovery in natural brackish water. *Aquaculture*. 34: 93-99.
- NUNES, E. S. S.; CAVERO, B. A. S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. 2006. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. *Pesquisa e agropecuária brasileira*. Brasília, v. 41, nº 1, p. 139 – 143.
- O’SULLIVAN, D.J. 1999. Methods of analysis of the intestinal microflora. In: TANNOCK, G.W. (Ed), *Probiotics: A critical review*. Horizont Scientific Press, Wymondham, England. 23 – 44.
- OLIVEIRA, A. M. B. M. S.; CONTE, L. e CYRINO, J. E. P. 2004. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Catagnolli, N. *Tópicos especiais em Piscicultura de Água Doce tropical Intensiva*. 1º ed. São Paulo: Editora TecArt.

- OLIVEIRA, R.P.C.; SILVA, P.C.; PADUA, D.M.C.; AGUIAR, M.; MAEDA, H.; MACHADO, N.P.; RODRIGUES, V.; SILVA, R.H. 2007. Efeitos da densidade de estocagem sobre a qualidade da água na criação do tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818) durante a segunda alevinagem, em tanques fertilizados. *Ciência Animal Brasileira*. 8(4): 705-711.
- OLSSON, J.C., WESTERDAHL, A., CONWAY, P.L. AND KJELLEBERG, S. 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)- and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 551-556.
- PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; KOBAYASHI, T.; SATOH, S.; SUGITA, H. 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 243: 241– 254.
- PARKER, R.B. 1974. Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition Helath*, 29: 4-8.
- PETRIC, M.C. 2000. Efeito da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, SP. 86p.
- PETRIC, M.C.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E. 2003. Polycarion macrophage formation kinetics in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Experimental model. Boletim do Instituto de Pesca*, 29 (2): 95 -100.
- PICKERING, A. D. e POTTINGER, T.G. 1987. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish. Despite interregal acclimation. *Journal of Fish Biology*. 30: 701-712.
- PULSFORD, A. L.; LEMAIRE-GONY, S. e TOMLINSON, M. 1994. Effects of acute stress on the immune system of the dab. *Limanda limanda*. *Comp.Biochem.Physiol.*109C(2): 129-139.
- RAIDA, M. K.; LARSEN, J. L.; NILSEN, M. E. e BUCHMANN, K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BIOPLUS2B). *Journal of Fish Diseases*, 26: 495 – 498.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e GODINHO, H.M. 1985. Estudos hematológicos em Curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (OSTEICHTHYES, CYPRINIFORMES, PROCHILODONTIDAE). Série vermelha. *Boletim do Instituto de Pesca*, 12 (2) : 25 – 35.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; GODINHO, H. M. 1986. Hematological characteristics of the curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindacher, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae), stocked in experimental conditions. *B. Inst. Pesca, São Paulo*.13: 115-120.

- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A. 2004. Hematologia de peixes Brasileiros In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M.A.P. Sanidade de Organismos Aquáticos, Varela, São Paulo, p. 89-120.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; RODRIGUES, E. L.; VEIGA, M. L. E EIRAS, A. C. 2001. Association between the hematological characteristics and the biology of the “dourado” *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 from Mogi-Guaçu River, state of São Paulo, Brazil. *Maringá*, 23(2): 527-533.
- RAMBHASKAR, B. e SRINIVASA-RAO, K. 1989. Influence of environmental variables on haematological, and compedium of normal haematological ranges of milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) in brackishwater culture. *Aquaculture*. 83: 123 - 136.
- REID, S.D.; MOON, T.W. e PERRY, S.F. 1992. Rainbow trout hepatocyte beta-adrenoceptors. Catecholamine responsiveness and effects of cortisol. *American Journal of Physiology*. 226: 794 – 799.
- RIEHI, R. e BAENSCH, H.A. 1991. *Aquarien Atlas*. Band. 1 Melleç Mergus. Verlag für Natur – und Heimtierkunde. Germany. 992.
- RIBEIRO, C.A.O.; ROULEAU, C.; PELLETIER, E.; AUDET, C. e TJALVE, H. 1999. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Artic Charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Sci. Technol.*, 33: 902 – 907.
- RIBEIRO, O.C.A.; NETO, F.; MELA, M.; SILVA P.H.; RANDI, M.A.F.; RABITTO I.S.; COSTA, A. J.R.M. E PELLETIER, E. 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environmental Research* 101: 74-80.
- RIEDE, K. 2004. Global register of migratory species - from global to regional scales. Final Report of the R&D-Projekt 808 05 081. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. 329 p.
- RINGO, E.; BIRKBECK, T. H.; MUNRO, P. D.; VADSTEIN, O. e HJELMELAND, K. 1996. The effect of early exposure to *Vibrio Pelagius* on the aerobic bacterial of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *J. Appl. Bacteriol.*, 81: 207 – 211.
- RYAN G. B.; SPECTOR W. G. 1970. Macrophage turnover in inflamed connective tissues. *Proceedings of the Royal Society of London (B)*, v. 175, p. 269-292
- RODRIGUEZ-HERNANDEZ A.; BLÉ-CASTILLO J.L.; JUÁREZ-OROPEZA M.A.; DIAZ-ZAGOYA J.C. 2001. Spirulina maxima prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. *Life Sciences* 2001; 69:1029-1037.
- ROGATTO, G. P., OLIVEIRA, C. A. M. de, SANTOS, J. W. *et al.* 2004. Influência da ingestão de espirulina sobre o metabolismo de ratos exercitados. *Rev Bras Med Esporte*, July/Aug. 10 (4), 258-263.
- ROSENFELD, G. 1947. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. *Men. Int. Butantã*, 20: 315-28.

- SAKABE, R. 2007. Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para Tilápia do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho. Dissertação de Mestrado. Centro de Aquicultura da Unesp. Jaboticabal. 78p.
- SAKAI, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. Ames Amsterdam. 172: 63 - 92 .
- SALAZAR, M.; MARTÍNEZ, E.; MADRIGAL, E.; RUIZ, L.E. e CHAMORRO, G.A. 1998. Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina máxima*. *Journal of Ethnopharmacology* 62 : 235–241.
- SANCHES, L.; LIMA, J.A.F.; FIALHO, E.T.; MURGAS, L.D.S.; ALMEIDA, E.C.; NETO, J.V.; FREITAS, R.T.F. 2006. Utilização de probiótico, prebiótico e simbiótico em rações de leitões ao desmame. *Ciência Agrotecnica*, 30(4):774-777.
- SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. 2001. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v. 84, p. 319-331.
- SANTOS, G.; FERREIRA, E. e ZUANON, J. 2006. Peixes Comerciais de Manaus – Manaus: Ibama/AM, ProVázea. p. 144.
- SAS SAS User's guide: statistics, 5 ed. Cary, NC:SAS Inst. Inc, 1985. 965p.
- SHETTY, H.P.C. e NANDEESHA, M.C. 1988. An overview of carp nutrition research in India. In: De SILVA, S.S. (Ed), *Finfish Nutrition Research in Asia: Proceedings of the Second Asian Fish Nutrition Network Meeting*. Heinemann Asia, Singapore. p. 96-116.
- SILVA, C.A. e CARNEIRO, P. 2007. Qualidade da água na engorda de tambaqui em viveiros sem renovação da água. Editoração eletrônica. Embrapa. www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2007/f_18_2007.pdf
- SILVA, J.A.M. da; PEREIRA-FILHO, M. e OLIVEIRA-PEREIRA, M.I.de. 2000. Seasonal variation of nutrients and energy in tambaqui's (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) natural food. *Revista Brasileira de Biologia*, 60 (4): 599 - 605.
- SILVA, J.A.M. da; PEREIRA-FILHO, M.; CAVERO, B.A.S; OLIVEIRA-PEREIRA, M.I. 2007. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) *Acta Amaz.*, 37 (1) 157-164.
- SILVEIRA-COFFIGNY, R.; PIETRO-TRUJILHO, A.; ASCENCIO-VALLE F. 2004. Effects of different stressor in hematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C, 139: 245-250.
- SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P. e STUDNICKA, M. 1994. The immune system of fish. *Archives of Polish Fisheries*, 2: 67 – 79.
- SOHAIL, S.S.; BRUYANT, M. M.; VOITLE, R. A. e ROLAND, D. A. 2002. Influence of calsporin on commercial leghorns. *J. Appl. Poult. Res.*, 11: 379 – 387.

- SUGITA, H.; HIROSE, Y.; MATSUO, N. e DEGUCHI, Y. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture*, 165: 269 – 280.
- SUZUKI, K. 1986. Morphological and phagocytic characteristic of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.*, London, 29 (3): p. 349-364.
- TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G.; MORAES, F. R. 2002. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*, Santa Maria, 32 (4): 693-698.
- TAVARES-DIAS, M. 2001. Physiology responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. *Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo, São Paulo*. 27(1): 43-48.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. 2003. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. *Bios. J., Uberlândia*, 19 (1): 107-114.
- TAVARES-DIAS, M. e MORAES, F.R. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. *Ribeirão Preto*. 144p.
- TORRES-DURÁN, P.V.; MIRANDA-ZAMORA, R.; PAREDES-CARBAJAL, M.C.; MASCHER, D. J.; DÍAZ-ZAGOYA, J.C. e JUA´REZ-OROPEZA, M. A. 1999. Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 64:141–147.
- TURNER, R. J. Amphibians In: ROWLEY, A. F., RATCLIFFE, N. N. A. Vertebrate blood cells. New York, Cambridge University Press, 1988, 129-209p.
- URBINATI, E. C. e CARNEIRO, P. C. F. 2001. Metabolic and hormonal responses of matrixã, *Brycon cephalus* (Teleost: Characidae) to transport stress under influence benzocaine. *J. Aqua. Trop.*, 16 (1): 75 – 85.
- VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. e FOSTER, G. D. 1993. Effects of cortisol on hepatic carbohydrate metabolism and responsiveness to hormones in the sea raven. *Fish Physiology and Biochemistry*. 12: 237 – 335.
- VIJAYAN, M. M. e MOON, T. W. 1994. The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucosa in a marine teleost, the sea raven. *Canadian Journal of Zoology*. 72: 379 – 386.
- VINE A, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. 2004. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters* 231:145-152.
- VITINI, E.; ALVAREZ S; MEDINA M.; MEDICI M.; DE BUDEGUER M. V.; PERDIGÓN G. 2000. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell, Mendoza*, v.24, n. 3, p. 223-232.

- ZELIKOFF, J.T.; ENAME, N.A.; BOWSER, D.; SQUIBB, K.S. e FRENKEL, K. 1991. Development of fish peritoneal macrophages as a model for higher vertebrates in immunotoxicological studies. *Fundamental Applied Toxicology*, 16: 576-589.
- WATANUKI, H.; OTA, K.; TASSAKKA, A.C.M.A.R., KATO, T.; SAKAI, M. A. 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*. 258:157–163.
- WENDELAAR BONGA, S. A. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. 77: 591 – 625.