

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

Eficácia de quimioterápicos adicionados à ração para *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes:Characidae) no controle de *Dolops Carvalhoi* (Crustacea:Branchiura) e *Anacanthorus Penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae)

Sergio Henrique Canello Schalch

Jaboticabal-SP
Outubro/2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS JABOTICABAL

Eficácia de quimioterápicos adicionados à ração para *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes:Characidae) no controle de *Dolops Carvalhoi* (Crustacea:Branchiura) e *Anacanthorus Penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae)

Aluno: Sergio Henrique Canello Schalch
Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes

Tese apresentada ao Centro de Aquicultura da Unesp, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aquicultura, área de concentração em Aquicultura.

Jaboticabal-SP
Outubro/2006

SUMÁRIO

Capítulo I - Considerações Gerais	1
Referências	7
Capítulo - II - Título	11
Índice de tabelas	12
Resumo	13
Abstrat	14
Introdução	15
Objetivos.....	16
Material e Método	16
Análise Estatística	20
Resultados e Discussão.....	21
1 – Qualidade da água	21
2 – Resultados do HPLC	21
3 – Eficácia das drogas sobre o <i>Anacanthorus.penilabiatus</i>	23
4 – Exposição da análise estatística do <i>Anacanthorus.penilabiatus</i>	25
5 – Eficácia das drogas sobre o crustáceo <i>Dolops Carvalhoi</i>	27
6 – Resultados da Avaliação dos Índices Zootécnicos	29
Conclusões.....	33
Referências	34
Capítulo – III - Título	37
Índice de tabelas	38
Resumo	39
Abstrat	40
Introdução	41
Objetivos.....	42
Material e Método	42
Análise Estatística	45
Resultados e Discussão.....	46
1 – Qualidade da água	46

2 – Resultados do HPLC	47
3 – Exposição da análise estatística da contagem diferencial de leucócitos	49
Conclusões.....	56
Referências	57
Capítulo – IV- Título	61
Índice de tabelas	62
Resumo	63
Abstrat	64
Introdução.....	65
Objetivos.....	66
Material e Método	66
Análise Estatística	69
Resultados e Discussão.....	70
1 - Qualidade da água	70
2 – Resultados do HPLC	71
3 – Parâmetros hematológicos e exposição da análise estatística	73
Conclusão	80
Considerações Finais	80
Referências	81
ANEXOS	84
Figura 1 – Vista do local de realização do experimento.....	84
Figura 2 - Ração peletizada contendo os princípios ativos: levamisol, praziquantel e diflubenzuron e/ou sua associação.	85
Figura 3 - Biometria em <i>Piaractus mesopotamicus</i> , comprimento total (centímetros e peso).	85
Figura 4 - Retirada das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	86
Figura 5 - <i>Piaractus mesopotamicus</i> intensamente parasitado pelo crustáceo <i>Dolops carvalhoi</i>	86
Figura 6 - Detalhe do parasito <i>D. carvalhoi</i>	87
Figura 7 - Espécies de monogenóides fixados nos filamentos brânquiais <i>Piaractus mesopotamicus</i>	87

Figura 8 - Em (A) hemorragia na região ventral de <i>P. mesopotamicus</i> parasitado por <i>D. carvalhoi</i> ; em (B) perda da integridade da pele e nadadeiras	88
Figura 9 - Punção da veia caudal, para retirada de alíquota de sangue do <i>Piaractus mesopotamicus</i>	88
Figura 10 - Extensões sanguíneas.....	89
Figura 11 - Valores médios de oxigênio dissolvido da água das caixas.....	90
Figura 12 - Valores médios de pH (potencial hidrogeniônico)	91
Figura 13 - Valores médios da temperatura da água das caixas.	92
Figura 14 - Valores médios dos níveis de amônia tóxica (NH ³)	93
Tabela 1 – Composição percentual básica da ração utilizada para veicular diferentes dosagens de Praziquantel, levamisol e diflubenzuron em pacus criados em cativeiro	94

DEDICO este trabalho:

**“A minha esposa Flávia e às filhas Marina e Alice que me proporcionam
muita paz, felicidade e harmonia”**

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao orientador Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes pelo fácil relacionamento nos diversos temas importantes que envolveram a realização deste trabalho.
- ❖ Aos meus pais por tudo que fizeram por mim.
- ❖ Dr. Vando Edésio Soares, pelo auxílio na análise estatística.
- ❖ Aos apoios dos funcionários do CAUNESP, Veralice, Elisandra, Donizete, Roberto, Valdecir, Márcio perereca, Márcio, dona Ana, Fátima, Mônica, seu Mauro, Sueli e Michele.
- ❖ A FAPESP pela bolsa e auxílio concedidos (proc. n° 03/01881-9).
- ❖ Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, Lia e Chica pela grande ajuda nas análises laboratoriais.
- ❖ Aos meus amigos do LAPOA e da Fisiologia Animal que não mediram esforços nos dias das colheitas, Eduardo (Twin), Camilo, Fabiana Pilarski, Fabiana Garcia, Karina, Fabiano e Rockinho.
- ❖ Ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro por fornecer os peixes que foram utilizados no experimento.
- ❖ A Prof^a. Dr. Elisabeth Criscuolo Urbinati por nos incluir na programação de experimentos concernentes às análises laboratoriais.
- ❖ Aos pesquisadores do Pólo Regional Noroeste Paulista-APTA pela compreensão da necessidade de finalização deste trabalho.

❖ Enfim a todos que direta ou indiretamente colaboraram para o sucesso desse trabalho, o meu agradecimento.

Capítulo I – Considerações Gerais

A expansão da piscicultura no Brasil trouxe consigo problemas sanitários relacionados à própria intensificação da atividade. O manejo zootécnico e o desequilíbrio ambiental atuam como fatores estressantes, induzindo nos peixes, aumento da concentração plasmática de cortisol e depressão dos mecanismos de defesa orgânica, aumentando a susceptibilidade às doenças infecciosas e parasitárias. Tal situação conduziu a piscicultura dos Estados Unidos da América a prejuízos estimados em U\$23.000.000,00 no ano de 1989. Deste montante, mais da metade, causado por infecções parasitárias (KLESIUS e ROGERS, 1995). No Brasil, não existem estatísticas confiáveis a esse respeito

Em pesqueiros do tipo pesque-pague da região Nordeste do Estado de São Paulo o percentual de ocorrência de parasitismo descrito por TAVARES-DIAS (2000) foi da ordem de 46,5% e por SCHALCH (2002) de 29,1%.

Segundo os achados de BÉKÉSI (1993) alcançaram 58,6%, em criações do nordeste brasileiro e, enquanto, MARTINS e ROMERO (1996), em pisciculturas dos Estados de São Paulo e Paraná, da ordem de 97,7%.

Durante o período de 1993 a 1998 foram diagnosticados agentes com potencial patogênico em diversas espécies de peixes examinados no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (Lapoa) do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), Jaboticabal, SP. Os parasitos de maior ocorrência que poderiam ser responsabilizados, pelo menos em parte, pelas alterações de comportamento e mortalidade de peixes foram monogenóides (36,6%), *Ichthyophthirius multifiliis* (29,5%), *Piscinoodinium pilulare* (18,0%), *Lernaea cyprinacea* adultos e copepoditos de *Lernaea cyprinacea* (15,2%). Segundo MARTINS et al. (2000), os parasitos estão normalmente presentes no ambiente e nos peixes e causam prejuízos pelos surtos epizoóticos que provocam (CECCARELLI et al., 1990; FIGUEIRA e CECCARELLI, 1991; MARTINS e ROMERO, 1996). Tais surtos resultam da ruptura do equilíbrio hospedeiro-parasito-ambiente (MARTINS et al., 2000).

Crustáceos da subfamília Branchiura, como *Argulus* sp e *Dolops* sp, podem ser encontrados parasitando a superfície corporal, nadadeiras e brânquias de várias espécies de peixes silvestres e de cativeiro, sendo popularmente conhecidos como “piolho de peixe” (EIRAS, 1994).

Segundo PRIETO et al. (1994) a diferença entre os dois gêneros reside na maxila que é modificada em ventosa no *Argulus* sp e em gancho no *Dolops* sp.

O crustáceo *Dolops* sp tem baixa especificidade parasitária, ciclo de vida direto, depositando seus ovos em substratos onde desenvolvem os crustáceos jovens, entre 10 e 50 dias, com características semelhantes a dos adultos, sobrevivendo fora do hospedeiro durante vários dias (NOGA, 1996). Sua multiplicação ocorre entre os meses de abril e setembro, dependendo das condições ambientais (KABATA, 1988).

Nos hospedeiros os parasitos localizam-se na superfície corporal, nadadeiras e brânquias. Alimentam-se fazendo com que seu aparelho bucal, dotado de estrutura semelhante à probóscide, penetre profundamente na superfície corporal, de onde sugam os fluidos que necessitam. A penetração do aparelho bucal causa dano mecânico ao hospedeiro e a injeção de enzimas tóxicas causa inflamação local (KABATA, 1988). No caso do *Dolops* sp a agressão é severa, visto que seu aparelho de fixação é dotado de ganchos. A esse trauma soma-se o fato de que mudam constantemente de lugar, amplificando os danos ao hospedeiro. Tomados por tais agressões os peixes passam a nadar agitada e erraticamente. Tendendo a rasparem-se nas paredes dos tanques ou quaisquer objetos, na tentativa de livrarem-se do incômodo (THACTHER e BRITES NETO, 1994).

Os sítios de agressão pelos parasitos apresentam hemorragias puntiformes, excesso de produção de muco e hiperpigmentação da pele. As brânquias parasitadas apresentam hiperplasia e hipertrofia do epitélio de revestimento e de células mucosas, além, de focos necróticos nos locais agredidos e, esses parasitos também podem atuar como vetores de bacterioses e viroses de importância em piscicultura. (SHIMURA et al, 1983).

Os Monogenoidea (Platelmintos) são ectoparasitos de peixes de água doce e salgada, freqüentemente encontrados na superfície corporal e brânquias, que somam cerca de 1500 espécies. Algumas delas comportam-se também como endoparasitos de peixes, quelônios e anfíbios (RODHE, 1993).

Os platelmintos da família Dactylogyridae têm forma alongada, são monoxêmicos, com exceção do *Diplozoon* sp, condição esta que favorece as grandes infestações. Ao liberarem seus ovos dão origem às larvas denominadas oncomiracídeos infectantes (RHODE, 1993) que causarão sérias injúrias aos peixes (KINKELIN et al., 1991).

Os helmintos monogenóides causam grandes prejuízos em alguns países europeus pelas altas taxas de parasitismo como é o caso do *Gyrodactylus salaris*, que promove sérios danos às criações de trutas e salmões (LANG e MELLERGAARD, 1999).

No Brasil a maioria das espécies de monogenóides foi descrita na região Amazônica, sendo que o gênero *Anacanthorus* é representado por 63 espécies, com exceção do *A. penilabiatus* (BOEGER et al., 1995) descritos em brânquias de *P. mesopotamicus*.

Os helmintos monogenóides alimentam-se das camadas superficiais do epitélio da pele e das brânquias, causando processo irritativo nesses locais. Com esse incômodo os peixes alteram seu comportamento tornando-se anoréxicos. Nadam de forma desorientada chocando-se contra as paredes do tanque, com subidas e descidas repentinas à superfície da água. . (MARTINS e ROMERO, 1996). Estes mesmos autores relataram que em peixes de cultivo doenças causadas por monogenóides comprometeram 33,3% de pacus (*P. mesopotamicus*), 19,1% de tambaquis (*C. macropomum*) e 17,4% ocorreram no híbrido tambacu. Observou-se grande quantidade destes parasitos nos filamentos branquiais, em que havia pontos hemorrágicos e aumento de volume. A infestação leve ou moderada teve como consequência inflamação e hiperplasia epitelial. No caso de alto parasitismo ocorreu hiperplasia basal de células epiteliais, focos necróticos, edema com desprendimento do epitélio e ruptura de células pilares.

Em estudo da fauna parasitária em pesqueiro tipo pesque-pague do município de Guariba-SP, SCHALCH (2002) observou alta prevalência de metazoários (monogenóides e *Dolops* sp.) em *Piaractus mesopotamicus*, *Leporinus macrocephalus* e *Cyprinus carpio*. Houve incremento da carga parasitária na primavera e verão acompanhando o aumento da temperatura da água dos viveiros.

O diflubenzuron (1-(4-clorofenil)-3-(2-6-diflurobenzoil) uréia)(DFB) que apresenta baixa toxicidade para vertebrados, é empiricamente utilizado para controle de crustáceos em peixes, e considerado um potente regulador de crescimento de artrópodes, pois interfere na síntese de quitina na fase de muda de estágios imaturos de insetos (EISLER, 1992). HOSBERG e HOY (1991) relataram que o referido produto tem potencial contra infestações causadas pelo “piolho de salmão” (*Caligus* sp), na dose de 75 mg/kg de peso vivo.

COLWELL e SCHAEFER (1980), investigaram a bioconcentração do diflubenzuron em *Ictalurus nebulosus* e em *Pomoxis nigromaculatus*. Resíduos do produto variaram de 291 a

466 ng/g de tecido nas duas espécies um dia após o tratamento. Contudo, os níveis residuais foram indetectáveis sete dias após o tratamento. Esses pesquisadores relataram que embora mudanças significantes na dieta tenham sido observadas por um mês após o tratamento, o crescimento individual dos peixes, o fator de condição e o grau de repleição estomacal não foram significativamente afetados pelo tratamento. APPERSON et al. (1978) relataram dados similares para *Lepomis macrochirus*. APPERSON et al. (1978) e SCHAEFER e DUPRAS, (1977) relataram que a quantidade de resíduos de diflubenzuron nos tecidos de *Pomoxis annularis* e *Lepomis macrochirus* foi 50 vezes superior à concentração na água, quatro dias após o tratamento. Ambos os estudos relataram rápida eliminação da substância dos tecidos, mas não especificaram o tempo exato de eliminação.

Segundo SCHAEFER e DUPRAS (1976, 1977) o pó molhável (WP 25) não é persistente na água de viveiros devido à hidrólise e absorção pela matéria orgânica de fundo. Quando foi utilizada palha como substrato orgânico em experimentos laboratoriais, a concentração do diflubenzuron diminuiu à medida que foi adsorvido pela matéria orgânica, indicando que este foi o maior fator para a adsorção e degradação do diflubenzuron no substrato.

Vários estudos investigaram os papéis do pH, da temperatura, da luz do sol e de microrganismos na degradação e persistência em ambiente de água doce. SCHAEFER e DUPRAS (1976) registraram que o diflubenzuron foi menos persistente em condições de pH (10) e temperatura (38°C) elevados.

ERDAL (1997) ressaltou o uso de diflubenzuron na forma de péletes de ração medicada para controle de "piolho de salmão" (*Caligus elongatus*, *Lepotheirus salmonis*) em criação de salmonídeos. Como primeira vantagem, a administração oral não dispersa o produto na água, sendo os metabólitos predominantemente excretados nas fezes e depositados para sedimentação e degradação. O segundo benefício do método de tratamento oral é a eliminação dos banhos terapêuticos, possibilitando o uso em grandes gaiolas em mar aberto.

Sua ação também foi descrita sobre o zooplâncton. LUDWIG (1993) avaliou o efeito de triclorfon, fention e diflubenzuron no manejo de berçários para “striped bass” *Morone saxatilis* e seus híbridos, e verificou menor sobrevivência dos peixes nos viveiros tratados com diflubenzuron, devido a menor disponibilidade de organismos planctônicos.

TANNER e MOFFETT (1995) num estudo sobre a reprodução e crescimento do “bluegill” (*Lepomis macrochirus*), observaram que indivíduos adultos submetidos a concentrações de 30 µg de diflubenzuron por litro d'água apresentaram menor taxa de eclosão e desenvolvimento larval. Os indivíduos jovens submetidos a este mesmo tratamento apresentaram taxa de crescimento reduzido.

A utilização desse produto no tratamento de parasitoses provocadas por crustáceos em peixes foi revisto por ROTH et al. (1993), porém salientando o cuidado na aplicação devido a problemas ambientais, apesar de que TANNER e MOFFETT (1995) tenham relatado sua aprovação pelo EPA (Environmental Protection Agency). A imersão prolongada de 0,03 mg de diflubenzuron por litro de água é a mais indicada, segundo NOGA (1996).

SCHAEFER et al. (1979) investigaram o potencial de bioacumulação de diflubenzuron em *P. annularis* e *L. macrochirus* expostos à concentração de 10 ppb, durante 24 horas. Encontraram o valor residual de 822 ppb e 848 ppb, respectivamente, indicando acumulação de aproximadamente 80 vezes. A quantidade remanescente nos tecidos mostrou ser dependente da concentração existente na água, mas, seu potencial de degradação e eliminação foi grande.

O praziquantel, geralmente usado em medicina humana para controlar infecções por trematóides e cestóides (REDMAN et al, 1996) e o levamisol para nematóides (ROBERTSON e MARTIN, 1993), prestam-se para controle de monogenóides de peixes. SCHMAHL e MEHLHORN (1985) demonstraram a efetividade de tratamento com praziquantel para *Dactylogyrus vastator*, *D. extensus* e *Diplozoon paradoxum*. Em carpas (*Cyprinus carpio*), nas doses de 0; 1,0; 5,0; 10,0 e 100,0 mg/L, a dose de 1,0 mg/L causou danos irreversíveis no tegumento do monogenóide após 30 minutos de exposição. Os resultados sugerem que a utilização de 10 mg/L, durante três horas, à temperatura de 22°C, foi eficaz para controlar estes parasitos.

Trabalhos relacionados do uso de praziquantel e levamisol no tratamento de doenças causadas por helmintos monogenéticos são escassos.

Atualmente, no Brasil, são empregados para o controle desta parasitose, a formalina e os organofosforados (POST 1987, SCHMAHL 1991, NOGA 1996).

De acordo com ONAKA et al, (1999) o praziquantel adicionado à ração, apresentou eficácia de 45,1% e 69,8%, respectivamente, para os tratamentos com 20 e 50 mg/kg peso

corpóreo ao final de 14 dias, no controle de *Anacanthorus penilabiatus* em pacus (*P. mesopotamicus*). Contrariamente aos achados anteriores, HIRAZAWA et al (2000), testaram a eficácia de doses de praziquantel (2000 e 4000mg/Kg de ração) em peixes parasitados por larvas de monogenóides (*Heterobothrium okamotoi*), observando diferenças significativas ($p<0,01$), quando comparou grupos de peixes controle e tratados com doses de até 4000mg de praziquantel/Kg de ração.

O levamisol, forma levógira do tetramisol, é um anti-helmíntico do grupo dos imidotiazóis e seu provável efeito no parasito, concentra-se na estimulação dos gânglios parassimpáticos e simpáticos, promovendo considerável ação imunoestimulante em mamíferos, provavelmente incrementando mecanismos imunomediados em linfócito - T periféricos (GUSTAFSSON et al., 1987). Parece atuar nas diferentes fases da resposta imune, interferindo no metabolismo dos nucleotídeos cíclicos, aumentando a quimiotaxia e a atividade fagocitária, bem como a exacerbação das reações de hipersensibilidade tardia. Em peixes provoca aumento do número de leucócitos circulantes, da atividade fagocitária de leucócitos, da atividade mieloperoxidase de neutrófilos e dos níveis séricos de lisozima (SIWICHI et al, 1994). Além disso, provoca aumento da atividade de linfócitos K e da concentração sérica da cadeia enzimática do sistema complemento (KAJITA et al., 1990). No que concerne à sua eficácia em parasitoses de peixes, é escassa a literatura, embora sua atividade estimuladora do sistema imune já tenha sido relatada (SIWICKI et al, 1990).

JENEY et al (1994) observaram a resposta imune de *Dicentrarchus labrax* submetidos a banhos em concentrações de 1,0mg e 5,0 mg levamisol/L de água, durante 30 minutos, verificando aumento do número de leucócitos e da atividade fagocitária.

Diante do exposto, a utilização de produtos como o praziquantel, levamisol e diflubenzuron adicionados à ração peletizada para *P. mesopotamicus*, contra os parasitos metazoários *D. carvalhoi* e *A. penilabiatus*, abre a possibilidade de controlar danos aos hospedeiros, bem como, evitar mortalidades e prejuízos da piscicultura, aumentando a lucratividade do produtor. Neste contexto, os objetivos da presente tese foram de avaliar a eficácia do uso do praziquantel, levamisol e diflubenzuron contra *Dolops carvalhoi* e *Anacanthorus penilabiatus* e verificar possíveis alterações sanguíneas advindas das parasitoses e/ou tratamentos.

REFERÊNCIAS

- APPERSON, C. S., C. H. SCHAEFER, A. E. COLWELL, G. H. WEMER, N. L. ANDERSON, E. F. DUPRAS, JR., AND D. R. LONGANECKER. Effects of diflubenzuron on *Chaoborus astictopus* and nontarget organisms and persistence of diflubenzuron in lentic habitats. *Journal of Economic Entomology*, v. 71, n. 1, p. 521-527, 1978.
- BEKESI, L. Evaluation of data on ichthyopathological analyses in the Brazilian Northeast. *Ciê. Cult.*, v. 44, n. 6, p. 400-403, 1993.
- BOEGER, W.A.; HUSACK, W.S.; MARTINS, M.L. Neotropical monogenoidea. 25. *Anacanthorus penilabiatus* n. sp. (Dactylogyridae: Anacanthorinae) from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), cultivated in the State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 90, n. 6, p. 699-701, 1995.
- CECCARELLI, P.S.; FIGUEIRA, L.B.; FERRAZ DE LIMA, C.B.L. & OLIVEIRA, C.A. Observações sobre a ocorrência de parasitas no CEPTA entre 1983 e 1990. *Boletim Técnico do CEPTA – Pirassununga-SP*, v. 3(único), p. 43 – 54, 1990.
- COLWELL, A. E; SCHAEFER, C. H. Diets of *Ictalurus nebulosus* and *Pomoxis nigromaculatus* altered by diflubenzuron. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* v. 37, n.5, p. 632-639, 1980.
- EIRAS, J.C. *Elementos de ictioparasitologia*. Porto, Portugal: Fundação Eng. Antônio de Almeida, 1ª ed, 1994.
- EISLER, R. Diflubenzuron hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish Wildlife Service and Biological Report.*, v. 4, n. 25 (I-II), p. 1-36, 1992.
- ERDAL, J.I. New drug treatment hits sealice when they are most vulnerable. *Fish farm. Int.*, v. 24, n. 2, vp. 1997.
- FIGUEIRA, L.B. CECCARELLI, P.S. Observações sobre a presença de ectoparasitas em pisciculturas tropicais do interior (CEPTA- região) entre janeiro e junho de 1991. *Boletim Técnico do CEPTA*, Pirassununga-SP, v.4, n 1, p. 57-65, 1991.
- GUSTAFSSON, L.L.; BEERMAN, B.; ABDY, Y.A. *Handbook of drugs for tropical parasitic infections*. London: Ed. Taylor & Francis, 1987.

- HIRAZAWA, N; OHTAKA, T; HATA, K. Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*, Oita , Japan, *Aquaculture*, v. 188, p. 1–13 , 2000.
- HOSBERG, T.E.; HOY, T. Tissue distribution of carbon-14 diflubenzuron in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 32, n. 4, p. 527-533, 1991.
- JENEY, G., GALEOTTI, M, VOLPATTI, D. Effects of immunostimulation on the non-specific immune response of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. In: *Abstract from the International Symposium on Aquatic Animal Health*, Sheraton Hotel, Seattle, Washington, September 4-8, 1994.
- KABATA, Z. Copepoda and Branchiura. In: Margolis, L., Kabata, Z. editors: Guide to the parasites of fishes of Canadá. Part II. Crustacea, Canadian Special Publication, *Fisheries Aquatic Science*, n. 101, p. 3-27, 1988.
- KAJITA, Y; SAKAI, M; ATSUTA, S; KOBAYASHI, M. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout *O. mykiss*. *Fish Pathol.*, n. 25, p. 93-98, 1990.
- KINKELIN, P. MICHEL, C. GHITTINO, P. *Tratado de las enfermedades de los peces*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A, 1991.
- KLESIUS, P.; ROGERS, W. Parasitisms of catfish and other farm raised food fish. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 207, p. 1473-1478, 1995.
- LANG, T. MELLERGAARD, S. The BMB/ICES Sea-Going Workshop “Fish Diseases and Parasites in the Baltic Sea” – introduction and conclusions. *ICES Journal of Marine Science*, Brasil, v. 56, p.129-133, 1999.
- LUDWIG, G.M. Effects of trichlorfon, fenthion and diflubenzuron on the zooplankton community and on production of reciprocal-cross hybrid striped bass fry culture ponds. *Aquaculture*, v. 110, p. 301-319, 1993.
- MARTINS, M.L.; ROMERO, N.G. Efectus del parasitismo sobre el tegido branquial en peces cultivados : Estudio parasitológico e histopatológico. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 13, n.2 , p. 489–500, 1996.
- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA, E.M.; SCHALCH, S.H.C.; NOGA, E.J. Fish Disease. *Diagnosis and Treatment*. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc., 1996.

- ONAKA, E.M, SCHALCH, S.H.C; MARTINS M L.; MORAES F. R. Adição de sulfóxido de albendazole e praziquantel na ração de pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887: Efeitos sobre helmintos monogenóides parasitos de brânquias e em parâmetros hematológicos, In: XI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. *Anais...* Salvador, 1999. 185p.
- POST, G. *Text book of Fish Health*. New Jersey: TFH, Inc., 1987.
- PRIETO A., FAJER E., VINJOY M. & MARTÍNEZ M, Parasites of Freshwater Cultured Fish. Differential Diagnostic Keys. *Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO*, Mexico, 1994, 60 p.
- REDMAN, C.A., ROBERTSON, A.P., FALLON, P.G., MODHA, J., KUSEL, J.R., DOENHOFF, M.J., MARTIN, R.J., Plaziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol. Today*, v.12, p. 14–20, 1996.
- RHODE, K. *Ecology of marine parasites*. CAB International, wallingford, U.K. 1993, 298p.
- ROBERTSON, S.J., MARTIN, R.J., Levamisole-activated single-channel currents from muscle of the nematode parasites *Ascaris suum*. *Br. J. Pharmacol.* v.108, p. 170–178, 1993.
- SAS Institute.SAS User's Guide: *Estatistics SAS Institute*, Inc. Cary, NC, USA,1989-1996.
- ROTH, M.; RICHARDS, R.H.; SOMMERVILLE, C. Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: a review. *Journal of Fish Diseases* v.16, n.1, p. 1-26, 1993.
- SILVA, E.D.; NOMURA, D.T.; SILVA, C.A.H. Parasitic infections in cultivated brazilian freshwater fishes. A survey of diagnosticated cases. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 9, n.1, p. 23-28, 2000.
- SIWICKI, A.K; ANDERSON, D.P; DIXON, O.W.. *In vitro* immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. *Dev. Comp. Immunol.* v. 14 p. 231-237, 1990.
- SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and immunopathology*. v.41, p.123-139, 1994.
- SCHAEFER, C.H.; DUPRAS, E.F., Jr. Factors affecting the stability of Dimilin in water and the persistence of Dimilin in field waters. *J. Agr. Food. Chem.*, v. 24, p.733 - 739, 1976.

- SCHAEFER, C.H.; DUPRAS, E.F., Jr. Residues of diflubenuron [1-(4-Chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea] in pasture soil, vegetation, and water falling aerial application. *J. Agr. Food. Chem.*, v. 25, p. 1026-1030, 1977.
- SCHAEFER, C. H; DUPRAS, JR. E. F; STEWART, R. J; DAVIDSON , L. W; COLWELL A. E. The accumulation and elimination of diflubenzuron by fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 21:249-254, 1979.
- SCHALCH, S.H.C.; *Apreciação da fauna ictioparasitária em pesqueiro tipo pesque-pague do município de Guariba-SP.*, 2002. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Aqüicultura, para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura. Jaboticabal.SP., 2002.
- SCHMAHL, G. & MEHLHORN, H. Treatment of fish parasites. *Z. Parasitenkd*, v.71, p.727-737, 1985.
- SCHMAHL, G. The chemotherapy of monogenens which parasitize fish: a review. *Folia Parasitologica* v. 38 p. 97-106, 1991.
- SHIMURA, S. Seasonal occurrence, sex ratio and site preference of *Argulus coregoni* Thorell (Crustacea:Branchiura parasitic on cultured freshwater salmonids in Japan. *Parasitology*, v. 86, n.3, p. 537-552, 1983.
- TANNER, D.K.; MOFFETT, M.F. Effects of diflubenzuron on the reproductive success of the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.14, p. 1345-1355, 1995.
- TAVARES-DIAS, M. *Estudos parasitológico e hematológico em peixes oriundos de pesque-pagues do município de Franca, SP.* 2000. Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Aqüicultura, para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura. Jaboticabal.SP., 2000.
- THATCHER,V.E.; BRITES-NETO, J.B. Diagnóstico, Prevenção e Tratamento de Enfermidades de Peixes Neo Tropicais de Água Doce . *Revista Brasileira Veterinária*, v.16, n. 3, p. 111-128, 1994.

Capítulo - II

Eficácia de Praziquantel, Levamisol e Diflubenzuron no controle de *Dolops Carvalhoi* (Crustacea:Branchiura) e *Anacanthorus Penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitando *Piaractus mesopotamicus* Holmberg,1887 (Osteichthyes: Characidae)

Efficacy of Praziquantel, Levamisole and Diflubenzuron in the control of *Dolops Carvalhoi* (Crustacea:Branchiura) and *Anacanthorus Penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasiting *Piaractus mesopotamicus* Holmberg,1887 (Osteichthyes: Characidae)

Sergio Henrique Canello Schalch^{1,2} ; Flávio Ruas de Moraes^{1,3}

1 - Unesp-Universidade Estadual Paulista - Centro de Aquicultura – Jaboticaba l-SP

2 - Pólo Regional Noroeste Paulista-APTA-Pesca e Aquicultura – Votuporanga - SP

3 - Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal-SP, Brasil. e-mail: fruas@fcav.unesp.br // sschalch@aptaregional.sp.gov.br

Artigo escrito de acordo com as normas da revista **Acta Scientiarum**

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resultados das concentrações de diflubenzuron, praziquantel e levamisol na ração detectadas por cromatografia líquida (HPLC).....	22
Tabela 2 - Resultados da análise de variância dos dados de contagens de Monogenóides (transformados em $\text{Log}(x+1)$).....	25
Tabela 3 – Número médio de <i>Anacanthorus penilabiatu</i> s nas colheitas três, sete e quinze dias pós-tratamentos em <i>P. mesopotamicus</i> alimentados via ração contendo praziquantel, levamisol e diflubenzuron.	26
Tabela 4 - Número médio de <i>Dolops carvalhoi</i> nas colheitas realizadas antes e três, sete e 15 dias após tratamento de pacus (<i>P. mesopotamicus</i>) com diferentes concentrações de diflubenzuron, praziquantel e levamisol adicionados na ração.crucados	27
Tabela 5 – Eficácia (%) de diferentes concentrações de diflubenzuron, praziquantel e levamisol, simples e associado ao praziquantel e/ou levamisol no controle de <i>Dolops carvalhoi</i> nos períodos três, sete e 15 dias após os tratamentos de pacus (<i>P. mesopotamicus</i>), alimentados via ração	28
Tabela 6 – Índices de desempenho zootécnico do <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentados durante sete dias com ração contendo praziquantel, levamisol e diflubenzuron via ração	29

RESUMO

Avaliou-se no presente trabalho, a eficácia anti-parasitária do praziquantel, levamisol e diflubenzuron administrados via oral, adicionados à ração e administrados a pacus (*Piaractus mesopotamicus*) infectados por *Anacanthorus penilabiatus* e *Dolops carvalhoi*. Foram utilizadas 19 caixas d'água de 300 litros de capacidade, comportando 28 peixes em cada uma. O alimento dos peixes foi feito misturando as drogas na ração. O experimento foi conduzido em quatro colheitas realizadas, um dia antes e três, sete e 15 dias após a aplicação dos medicamentos. A alimentação dos peixes com ração contendo diflubenzuron, levamisol e praziquantel isolado ou associados em diferentes concentrações foi feita durante sete dias. Os resultados da eficácia terapêutica sugerem que simples ou associado com levamisol e praziquantel, o diflubenzuron é eficiente contra o crustáceo *D. carvalhoi*, demonstrando que a eficácia dos tratamentos nos dias três, sete e 15 foi de 96,2 a 100%. Contra os monogenóides as drogas não apresentaram eficácia satisfatória. Os resultados sugerem o uso do diflubenzuron para o controle de *D. carvalhoi* em peixes de cativeiro nas condições deste ensaio.

Palavras-chave: *Dolops carvalhoi*, *Anacanthorus penilabiatus*, anti-parasitários, praziquantel, levamisol, diflubenzuron, *Piaractus mesopotamicus*.

ABSTRACT

This assay evaluated the control efficacy of diflubenzuron, praziquantel and levamisole added to the diet of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with *Anacanthorus penilabiatus* and *Dolops carvalhoi*. Nineteen water tanks of 300 liters capacity were utilized with 28 fish in each one. The treatments were made by mixing the active principles in the diet. The experiment was evaluated in four harvests done one day before and three, seven and 15 days after the treatment. The medicated feeding was applied for seven days. The results of efficacy suggest that the diflubenzuron alone or associated with levamisole and praziquantel was efficient against the crustacean *D. carvalhoi* and the efficacy in the three, seven and 15 days evaluations ranged from 96,2 to 100%. Against the monogenean the drugs did not present efficacy. The results suggest the use of diflubenzuron for the control of *D. carvalhoi* in captive fishes in the conditions of this trial.

Key-words: *Dolops carvalhoi*, *Anacanthorus penilabiatus*, praziquantel, levamisole, diflubenzuron, *Piaractus mesopotamicus*.

INTRODUÇÃO

A criação intensiva torna os peixes mais susceptíveis às enfermidades, como decorrência do estresse infringido pelo manejo zootécnico e pela má qualidade da água. Esta última favorece a proliferação de organismos com potencial patogênico acarretando surtos de doenças infecciosas e parasitárias, prejudicando sobremaneira a atividade (MORAES e MARTINS, 2004). As parasitoses causam perdas significantes para as pisciculturas, com relevância no neotrópico, pelas características climáticas pertinentes à região, que propiciam suas rápida e constante propagação (THATCHER e BRITES-NETO 1994). Baixas temperaturas durante o inverno em regiões de clima temperado podem retardar o desenvolvimento de epizootias, pois prolongam ciclo biológico de várias espécies de parasitos (MEYER 1970). Por outro lado, em regiões que mantém certa constância na temperatura, como nas intertropicais, variações sazonais do parasitismo não são significativas (BAUER e KARIMOV 1990). Contudo pequenas variações sazonais coincidem com a elevação da temperatura da água dos viveiros na primavera e verão quando peixes como *Leporinus macrocephalus* e *Piaractus mesopotamicus* apresentam-se intensamente parasitados por *Anacanthorus penilabiatus* e *Dolops carvalhoi* (SCHALCH et al, 2005). O estresse como consequência da má qualidade do ambiente aquático ou do manejo inadequado, atua como fator predisponente para várias enfermidades parasitárias e infecciosas, mesmo em ambientes em que a variação da temperatura da água é estreita (SINGHAL et al. 1986; RANZANI-PAIVA 1997, TAVARES-DIAS et al., 2001 a,b).

Tentativas de controle de parasitoses em peixes de cativeiro são realizadas com a utilização de diferentes agentes quimioterápicos. IRIZAWA et al. (2001) avaliaram a eficácia do ácido caprílico nas temperaturas da água de 15, 20 e 25°C, contra o monogenóide *Heterobothrium okamotoi*, parasito de *Takifugu rubripes*. Foram testadas quatro doses do produto em dietas peletizadas (25, 50, 100 e 200mg/Kg de ração). O melhor efeito anti-helmíntico foi com 100mg/Kg de ração. A temperatura da água não influenciou o resultado.

Benzoato de emamectin foi administrado durante sete dias consecutivos, 50 µg/kg de biomassa, por dia, para controle de *Lepeophtheirus salmonis* e *Caligus elongatus* ectoparasitos crustáceos de *Salmo salar*. Os percentuais de eficácia foram de 45, 80 a 91%, aos sete, 14 e 21 dias de observação respectivamente (STONE et al., 2000).

Azamethiphos, um organofosforado, apresentou eficácia de 96% no controle de formas jovens e adultas de *Lepeophtheirus salmonis* e *Caligus* spp na dosagem de 0,1 ppm, em banhos de 60 minutos em enguias, *Anguilla anguilla* (PRETTI et al, 2002).

OBJETIVOS

Como forma de ampliar os conhecimentos sobre métodos de controle de parasitos de peixes de cativeiro, este ensaio teve como objetivo, avaliar a eficácia de doses simples ou associadas de diflubenzuron, praziquantel e levamisol veiculados na ração para o controle de *A. penilabiatus* e *D. carvalhoi* em pacus, *P. mesopotamicus*.

MATERIAL E MÉTODO

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da Unesp (Caunesp) e no laboratório de Ictiopatologia do Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, localizado a 21°15'22" Latitude S e 48°18'58" Longitude W., com altitude de 595metros.

Um lote inicial de 1400 exemplares de pacu (*P. mesopotamicus*) jovens, oriundos de piscicultura comercial e de mesma desova foi aclimatado em dois tanques de alvenaria de 16m³, contendo água livre de cloro, durante quinze dias, sendo alimentados com ração comercial. Destes, foram selecionados 532 espécimes, pesando entre 40 e 100 gramas, que foram transferidos para 19 caixas d'água de plástico (n=28) com 300 litros de capacidade, fluxo contínuo de água e aeração por soprador. Antes de serem experimentalmente infestados, foram submetidos a banhos de formalina a 10 ppm e posteriormente NaCl (20 g/L), para ficarem livres de ectoparasitos.

Em seis caixas d'água de 300 litros foram acondicionados os peixes naturalmente infectados por parasitos adultos. Esses peixes eram da espécie *Piaractus mesopotamicus*, portador de *Dolops carvalhoi*. Em cada caixa d'água foram colocados substratos como canos de PVC e tiras de isopor que fizeram o papel de ninhos para facilitar a reprodução do parasito. Após a eclosão dos ovos, foram adicionados à água, algas verdes (*Ankistrodesmus gracilis*) cultivadas em laboratório para alimentar náuplios e metanáuplios de vida livre. Este período de crescimento variou de 10 a 50 dias, dependendo da temperatura da água. Parte dela foi

filtrada diariamente em malha de 75 μm e os elementos retidos foram examinados em estereomicroscópio a fim de avaliar a presença de metanúplios de *D. carvalhoi*. Caso positivo, os mesmos parasitos permaneceram nas caixas d'água até atingirem o estágio pré-adulto, assim utilizados para infestação. Em seguida foi realizada a retirada dos parasitos dos peixes com auxílio de pincel e, após, foi feita a contagem e sua transferência para os 19 recipientes de vidro, com capacidade de 500mL, até obter o número necessário para a infestação. A quantidade de parasitos que originaram infestações não muito severas foi de 400 em cada caixa d'água.

Para infestações com helmintos *Anacanthorus penilabiatus* foram utilizados exemplares adultos de *P. mesopotamicus*, oriundos de pesque-pague e/ou pisciculturas comerciais, após prévio exame parasitológico. Estes animais foram acondicionados junto com os mais jovens em tanques de alvenaria de 16m³, por duas semanas, tempo necessário para a transmissão (THATCHER, 1991; MONTEROS e LABARTA, 1988). Em seguida os peixes foram capturados, selecionados por tamanho para se obter a maior homogeneidade do lote e, assim, distribuídos nas caixas d'água para posterior tratamento.

Os tratamentos foram implementados adicionando-se à ração basal (Tabela 1) os princípios ativos praziquantel(PZQ), levamisol(LVM) e diflubenzuron(DFB). Os peixes foram alimentados com a ração medicada constituindo os grupos de tratamento abaixo descritos:

- ✓ T-O ⇨ Controle, dieta basal
- ✓ T-1 ⇨ PZQ*1000mg + 1000mg DFB**/Kg dieta basal
- ✓ T-2 ⇨ PZQ 1000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
- ✓ T-3 ⇨ PZQ 2000mg + 1000mg DFB/Kg dieta basal
- ✓ T-4 ⇨ PZQ 2000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
- ✓ T-5 ⇨ LVM***1000mg + 1000mg DFB/Kg dieta basal
- ✓ T-6 ⇨ LVM 1000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
- ✓ T-7 ⇨ LVM 2000mg + 1000mg DFB/Kg dieta basal
- ✓ T-8 ⇨ LVM 2000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
- ✓ T-9 ⇨ DFB 1000mg /Kg dieta basal
- ✓ T-10 ⇨ DFB 2000mg /Kg dieta basal
- ✓ T-11 ⇨ LVM 1000mg + 1000mg PZQ/Kg dieta basal
- ✓ T-12 ⇨ LVM 1000mg + 2000mg PZQ/Kg dieta basal
- ✓ T-13 ⇨ LVM 2000mg + 1000mg PZQ/Kg dieta basal
- ✓ T-14 ⇨ LVM 2000mg + 2000mg PZQ/Kg dieta basal
- ✓ T-15 ⇨ PZQ 1000mg /Kg dieta basal
- ✓ T-16 ⇨ PZQ 2000mg /Kg dieta basal
- ✓ T-17 ⇨ LVM 1000mg /Kg dieta basal
- ✓ T-18 ⇨ LVM 2000mg /Kg dieta basal

✓ * Praziquantel, ** Diflubenzuron e *** Levamisol

A essa ração contendo 26% de proteína bruta e 4150 Kcal de energia bruta foi adicionado o praziquantel, levamisol e diflubenzuron de acordo com o delineamento proposto. Devido à quantidade relativamente pequena do produto adicionado, foi feita uma pré-mistura com 100g da ração basal antes de se homogeneizar com o restante de cada partida, e em seguida peletizada. O diflubenzuron utilizado estava na forma de pó (25%) em saco de 0,5 Kg; o praziquantel em pó (98%) e o levamisol líquido a 23%. Estes produtos foram adquiridos no mercado. A presença dos princípios ativos foi avaliada por análise da ração por cromatografia líquida (HPLC) (LABTEC - Guabi).

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, de manhã e à tarde, na proporção diária de até 3% da biomassa, durante sete dias.

A avaliação da eficácia da ração medicada foi realizada em quatro oportunidades, mediante exame parasitológico. Assim, de cada caixa d'água foram abatidos, um número de sete peixes em cada período como delineado, antes do tratamento, após três dias, aos sete dias e aos quinze dias. Após retirada de sete peixes de cada colheita, o volume de água foi diminuído proporcionalmente, para que não houvesse diferenças de densidade.

Diariamente foram monitorados temperatura, pH e oxigênio dissolvido. A cada três dias foi determinada a concentração de amônia, incluindo-se o período de tratamento.

Em cada colheita os peixes foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína a 0,1g/10L de água, medidos e pesados. Para determinação dos índices zootécnicos foram utilizadas as equações:

$$\text{Ganho em peso diário (GPD)} = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{tempo}$$

$$\text{Consumo diário (CD)} = \text{consumo de alimento} / \text{tempo}$$

$$\text{Taxa de conversão alimentar (TCA)} = \text{consumo de alimento} / \text{ganho em peso total}$$

$$\text{Biomassa ganha} = \text{biomassa final} - \text{biomassa inicial}$$

Para avaliação da eficácia das rações medicadas os peixes foram submetidos a exame parasitológico como se segue:

A. *penilabiatatus*: após a anestesia o muco da superfície do corpo foi raspado e colocado em frascos com formalina 1:4000. Para colheita de sangue, sacrifício dos peixes por anestesia profunda e biometria, as brânquias foram retiradas, seus arcos separados e colocados em frascos de 200mL, contendo 20mL de formalina a 1:4000. Após descanso por uma hora nessa

solução, os frascos foram agitados vigorosamente e o conteúdo resuspenso em formalina 5%. Os filamentos branquiais foram raspados cuidadosamente com o auxílio de lâminas de bisturi para retirada dos parasitos. Os espécimes foram conservados em formalina 5% para posterior contagem em estereomicroscópio. Para tanto, o sobrenadante dos frascos contendo o muco e brânquias desprezado e o restante contendo os espécimes transferido para placas de Petri quadriculadas. A identificação dos parasitos foi realizada de acordo com a recomendação de THATCHER (1991).

D. carvalhoi: foram colhidos das narinas, do corpo e/ou boca, com auxílio de pinça, fixados em álcool 70% sendo adicionado 10% de glicerina para conservação e posterior contagem com auxílio de lupa. O percentual de eficácia dos tratamentos foi calculado obedecendo à equação:

$$\text{Percentual de Eficácia} = \frac{\text{Média do número de parasitos do grupo controle} - \text{Média do número de parasitos do grupo tratado}}{\text{Média do número de parasitos do grupo controle}} \times 100$$

Análise Estatística

Os resultados das contagens de monogenóides foram transformados em log (x+1) segundo LITTLE & HILLS (1978) e analisados em delineamento inteiramente casualizado. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 95% de confiança. Tais análises foram efetuadas utilizando o Software SAS versão 8.2 (SAS, 1999-2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 -Qualidade da água

A análise do oxigênio dissolvido, potencial hidrogeniônico (pH), temperatura da água e amônia tóxica (NH³) se manteve dentro da normalidade para a espécie estudada. De acordo com CASTANGNOLLI, (1992), SIPAÚBA-TAVARES, (1995) e OSTRENKY e BOEGER, (1998). Não interferindo portanto nos resultados obtidos.

2 - Resultados do HPLC

Os resultados da análise por cromatografia líquida (HPLC) das rações medicadas estão expressos na Tabela 1. Os resultados indicam os níveis reais dos princípios ativos presentes na ração. Entre as substâncias utilizadas, o praziquantel apresentou níveis próximos ao que foi adicionado à ração, assim como o diflubenzuron para 1000 mg/kg. Neste último caso, quando a dose foi aumentada para 2000 mg/kg quase a metade se perdeu, o mesmo ocorrendo com o levamisol. Este último era líquido e pode ter se perdido no momento de sua inclusão na ração devido à pulverização sobre ela, ou seja, parte foi adicionada à ração e o restante evaporado.

Tabela 1 - Resultados das concentrações de diflubenzuron, praziquantel e levamisol na ração detectadas por cromatografia líquida (HPLC).

Níveis reais de princípios ativos adicionados nas rações	Níveis de princípios ativos detectados na ração por meio de análise (HPLC)
T-1 ⇒ PZQ 1000mg + 1000mg DFB	T-1 ⇒ PZQ 0,950mg + 0,941mg DFB
T-2 ⇒ PZQ 1000mg + 2000mg DFB	T-2 ⇒ PZQ 0,952mg + 1243mg DFB
T-3 ⇒ PZQ 2000mg + 1000mg DFB	T-3 ⇒ PZQ 1952mg + 0,935mg DFB
T-4 ⇒ PZQ 2000mg + 2000mg DFB	T-4 ⇒ PZQ 2010mg + 1273mg DFB
T-5 ⇒ LVM 1000mg + 1000mg DFB	T-5 ⇒ LVM 0,380mg + 0,949mg DFB
T-6 ⇒ LVM 1000mg + 2000mg DFB	T-6 ⇒ LVM 0,184mg + 1237mg DFB
T-7 ⇒ LVM 2000mg + 1000mg DFB	T-7 ⇒ LVM 0,436mg + 0,968mg DFB
T-8 ⇒ LVM 2000mg + 2000mg DFB	T-8 ⇒ LVM 0,436mg + 1291mg DFB
T-9 ⇒ DFB 1000mg	T-9 ⇒ DFB 0,935mg
T-10 ⇒ DFB 2000mg	T-10 ⇒ DFB 1254mg
T-11 ⇒ LVM 1000mg + 1000mg PZQ	T-11 ⇒ LVM 0,350mg + 0,958mg PZQ
T-12 ⇒ LVM 1000mg + 2000mg PZQ	T-12 ⇒ LVM 0,341mg + 1899mg PZQ
T-13 ⇒ LVM 2000mg + 1000mg PZQ	T-13 ⇒ LVM 0,669mg + 0,922mg PZQ
T-14 ⇒ LVM 2000mg + 2000mg PZQ	T-14 ⇒ LVM 0,438mg + 1152mg PZQ
T-15 ⇒ PZQ 1000mg	T-15 ⇒ PZQ 0,977mg
T-16 ⇒ PZQ 2000mg	T-16 ⇒ PZQ 1964mg
T-17 ⇒ LVM 1000mg	T-17 ⇒ LVM 0,362mg
T-18 ⇒ LVM 2000mg	T-18 ⇒ LVM 0,640mg

A diminuição na dosagem do levamisol, tanto para a maior quanto para a menor dose, observa-se que se perdeu, influenciando a ação do levamisol contra os monogenóides, pois, não foi possível observar o efeito máximo desejado como se havia proposto no início do experimento. O mesmo não ocorreu com o praziquantel, pois o tratamento que tinha a menor dose foi o único no qual se observou significância estatística no dia três, sete e 15 contra o parasito monogenóide. Já para o diflubenzuron, a perda da substância só foi verificada nos tratamentos que se utilizou dose alta. No entanto, pouco influenciou no resultado final.

3 - Eficácia das drogas sobre o *A. penilabitus*.

Os resultados apresentados na Figura 1 permitem verificar que tanto os tratamentos de um a quatro (praziquantel associado com diflubenzuron), como os de cinco a sete (levamisol combinado com diflubenzuron) mostraram relativa eficácia contra *A. penilabitus*, aos três, sete e 15 dias. Baixa eficácia foi observada nos grupos em que se utilizaram substâncias puras, ou a associação de praziquantel e levamisol. A eficácia foi confirmada somente após três dias, decaindo nas realizadas aos sete e 15 dias. Desta maneira, o aumento nos dias de tratamento pode ser indicativo de melhora da eficácia dos quimioterápicos combinados. Apenas no tratamento dois a eficácia se manteve em elevação até o último dia de colheita.

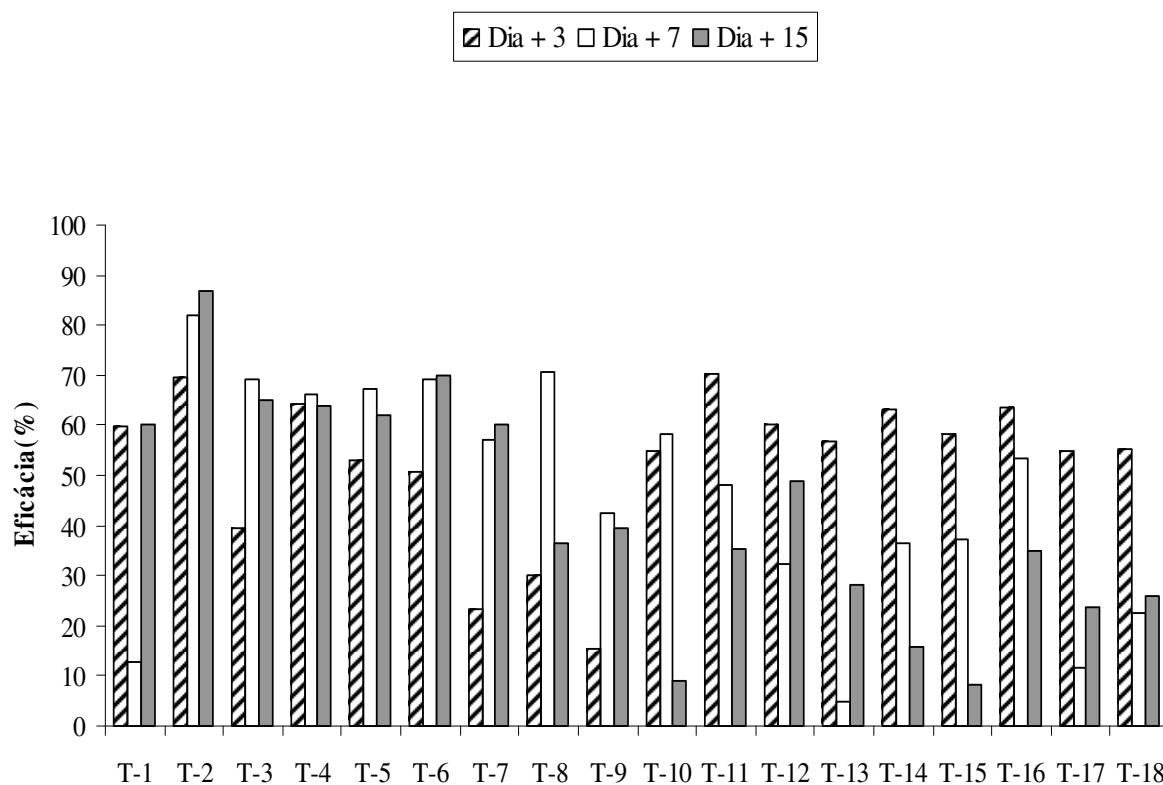


Figura 1 – Percentual de eficácia dos antiparasitários contra o helminto *Anacanthorus penilabitus* após tratamento com praziquantel e diflubenzuron (T-1 a T-4); levamisol e diflubenzuron (T-5 a T-8); diflubenzuron (T-9 e T-10); levamisol e praziquantel (T-11 a T-14); praziquantel (T-15 e T-16) ou levamisol (T-17 e T-18) em avaliações realizadas após três, sete e 15 dias, em *P. mesopotamicus* alimentados via ração.

Tabela - 2 Resultados da análise de variância dos dados de contagens de Monogenóides (transformados em Log (x+1))

Tratamento	Colheitas / Médias ¹ [$=\Sigma(\log(x+1)/n)$] de Monogenóides			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
0	1,9332 ^{ACD}	2,2455 ^{AB}	2,2124 ^{AB}	1,8647 ^{ABC}
1	2,0752 ^{ABC}	1,9650 ^{CDE}	2,2119 ^{AB}	1,8476 ^{ABC}
2	1,7302 ^{CD}	1,8610 ^E	1,6036 ^E	1,3709 ^D
3	1,8010 ^{CD}	2,1469 ^{ABCD}	1,6793 ^{DE}	1,7471 ^{BCD}
4	2,2770 ^A	1,9004 ^{DE}	1,8106 ^{CDE}	1,8088 ^{ABC}
5	1,9287 ^{ACD}	2,0204 ^{BCDE}	1,8375 ^{BCDE}	1,8206 ^{ABC}
6	2,2621 ^{AB}	2,0535 ^{ABCDE}	1,8299 ^{BCDE}	1,6708 ^{CD}
7	1,8024 ^{CD}	2,2443 ^{AB}	1,9511 ^{ABCDE}	1,8319 ^{ABC}
8	1,9237 ^{ACD}	2,2092 ^{ABC}	1,8164 ^{BCDE}	2,0132 ^{ABC}
9	2,0358 ^{ABC}	2,3013 ^A	2,1007 ^{ABC}	1,9779 ^{ABC}
10	2,0527 ^{ABC}	2,0113 ^{BCDE}	1,9287 ^{ABCDE}	2,1963 ^A
11	1,9066 ^{CD}	1,8480 ^E	2,0306 ^{ABCD}	1,9590 ^{ABC}
12	1,8350 ^{CD}	1,9434 ^{CDE}	2,1532 ^{ABC}	1,9480 ^{ABC}
13	1,5680 ^D	2,0162 ^{BCDE}	2,0803 ^{ABC}	2,1063 ^{AB}
14	2,0353 ^{ABC}	1,9442 ^{CDE}	2,1113 ^{ABC}	2,1577 ^A
15	1,7281 ^{CD}	1,9237 ^{DE}	2,1166 ^{ABC}	2,1557 ^A
16	1,9816 ^{ABC}	1,9251 ^{DE}	1,9034 ^{ABCDE}	2,0720 ^{AB}
17	1,7633 ^{CD}	2,0235 ^{BCDE}	2,2778 ^A	2,1380 ^{AB}
18	2,0788 ^{ABC}	2,0234 ^{BCDE}	2,2009 ^{ABC}	2,0157 ^{ABC}

Análise de Variância				
Valor de F	6,4	6,62	6,06	7,02
Pr > F*	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Coeficiente de Variação	9,85	6,88	10,45	10,53
DMS**	0,3662	0,2692	0,4007	0,3914

¹Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

*Probabilidade de significância do valor de F

**Diferença mínima significativa

As diferenças significativas observadas na Tabela 2, foram relativas aos tratamentos dois, na segunda, terceira e quarta colheita. A associação do praziquantel com diflubenzuron mostrou melhores resultados quando comparada aos fármacos simples, associado e em relação ao controle, mantendo sua ação antiparasitária nas demais análises. Resultados significativos foram somente verificados na segunda colheita dos grupos onze (levamisol e praziquantel menor dose), quatorze (levamisol e praziquantel maior dose), quinze e dezesseis (praziquantel), e na terceira colheita do grupo três. Contudo, esses resultados não foram confirmados nas demais colheitas.

Tabela 3 – Número médio de *Anacanthorus penilabiatu*s nas colheitas três, sete e quinze dias pós-tratamentos em *P. mesopotâmicu*s alimentados via ração contendo praziquantel, levamisol e diflubenzuron.

TRATAMENTOS (mg/Kg de ração*)		Nº médio de <i>Anacanthorus penilabiatu</i> s		
		3 dias	7 dias	15 dias
T-0	CONTROLE	238,0	222,0	180,0
T-1	PZQ 0,950 + 0,941 DFB	96,0	194,0	72,0
T-2	PZQ 0,952 + 1243 DFB	72,1	40,1	24,0
T-3	PZQ 1952 + 0,935 DFB	144,3	68,4	62,6
T-4	PZQ 2010 + 1273 DFB	85,0	75,7	65,0
T-5	LVM 0,380 + 0,949 DFB	112,1	72,6	68,4
T-6	LVM 0,184 + 0,1237 DFB	117,0	68,0	54,0
T-7	LVM 0,436 + 0,968 DFB	182,6	95,6	71,7
T-8	LVM 0,436 + 1291 DFB	166,7	65,4	114,3
T-9	DFB 0,935	201,0	127,7	109,3
T-10	DFB 1254	107,0	93,0	163,6
T-11	LVM 0,350 + 0,958 PZQ	71,0	113,6	116,6
T-12	LVM 0,341 + 1899 PZQ	93,6	150,0	92,0
T-13	LVM 0,669 + 0,922 PZQ	130,0	122,7	129,0
T-14	LVM 0,438 + 1152 PZQ	88,0	141,4	151,7
T-15	PZQ 0,977	99,3	139,4	165,3
T-16	PZQ 1964	87,0	103,4	117,1
T-17	LVM 0,362	107,0	196,3	137,4
T-18	LVM 0,640	108,0	171,4	133,0

• PZQ = praziquantel, LVM = levamisol e DFB = diflubenzuron.

O número de monogenóides do grupo controle foi maior em relação a todos os tratamentos realizados e aos três dias de colheita após o início dos tratamentos. Pela Tabela 3 é

possível verificar diminuição da quantidade de parasitos branquiais nos grupos tratados com praziquantel, levamisol e diflubenzuron simples e associados. Contudo só foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) quando o praziquantel foi associado com diflubenzuron (tratamento dois), nos dias três, sete e 15 quando comparado ao controle. E no grupo onze onde se observou diferença significativa apenas na segunda colheita não confirmada nas demais.

4 - Eficácia das drogas sobre o crustáceo *D. carvalhoi*.

Os testes de eficácia revelaram que o diflubenzuron tanto na dose menor quanto na maior apresentou alta eficácia contra *D. carvalhoi* (Tabela 4).

Tabela 4 - Número médio de *Dolops carvalhoi* nas colheitas realizadas antes e três, sete e 15 dias após tratamento de pacus (*P. mesopotamicus*) com diferentes concentrações de diflubenzuron, praziquantel e levamisol adicionados na ração.

TRATAMENTOS (mg/Kg ração*)		Número médio de parasitos (<i>Dolops carvalhoi</i>)			
		Controle	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta
T-1	PZQ 0,950 + 0,941 DFB	55	2	0	0
T-2	PZQ 0,952 + 1243 DFB	32	0	0	0
T-3	PZQ 1952 + 0,935 DFB	44	0	0	0
T-4	PZQ 2010 + 1273 DFB	56	0	0	0
T-5	LVM 0,380 + 0,949 DFB	53	2	0	0
T-6	LVM 0,184 + 0,1237 DFB	141	0	0	0
T-7	LVM 0,436 + 0,968 DFB	59	0	0	0
T-8	LVM 0,436 + 1291 DFB	59	1	0	0
T-9	DFB 0,935	58	0	0	0
T-10	DFB 1254	36	1	0	0

* PZQ = praziquantel, LVM = levamisol e DFB = diflubenzuron.

Na Tabela 4 é possível observar que o número médio de *D. carvalhoi* apresentou redução da segunda, e anulação total na terceira e última colheita. Não foram observados parasitos na superfície corporal dos peixes e nem nas caixas de água ao término do ensaio. Os peixes apresentavam-se sadios e com coloração brilhante durante e após os tratamentos.

Tabela 5 – Eficácia (%) de diferentes concentrações de diflubenzuron, praziquantel e levamisol, simples e associado ao praziquantel e/ou levamisol no controle de *Dolops carvalhoi* nos períodos três, sete e 15 dias após os tratamentos de pacus (*P. mesopotamicus*), alimentados via ração.

TRATAMENTOS	EFICÁCIA (%)		
	DIAS DE COLETA		
	3	7	15
T-1 PZQ 0,950 + 0,941 DFB	96,3	100	100
T-2 PZQ 0,952 + 1243 DFB	100	100	100
T-3 PZQ 1952 + 0,935 DFB	100	100	100
T-4 PZQ 2010 + 1273 DFB	100	100	100
T-5 LVM 0,380 + 0,949 DFB	96,2	100	100
T-6 LVM 0,184 + 0,1237 DFB	100	100	100
T-7 LVM 0,436 + 0,968 DFB	100	100	100
T-8 LVM 0,436 + 1291 DFB	98,3	100	100
T-9 DFB 0,935	100	100	100
T-10 DFB 1254	97,2	100	100

* PZQ = praziquantel, LVM = levamisol e DFB = diflubenzuron.

Nesta Tabela 5, verifica-se que após três, sete e quinze dias de tratamento o diflubenzuron apresentou alta eficácia contra a forma pré-adulta deste crustáceo. O praziquantel e o levamisol que foram associados ao diflubenzuron por não serem específicos para controlar infestações por crustáceos. Assim, a eficácia do diflubenzuron simples ou associado foi semelhante. Dados similares foram obtidos por SCHALCH et al, (2005) que realizou banhos terapêuticos de trinta minutos com diflubenzuron (2mg/litro de água) em pacus naturalmente infectados pelo mesmo parasito, obtendo eficácia de 97,2%. Esses resultados permitem indicar, para o controle deste parasito, três a sete dias de tratamento com diflubenzuron adicionado na ração.

5 – Resultados da avaliação dos Índices Zootécnicos

A tabela 6 expressa os resultados encontrados na avaliação dos índices zootécnicos de pacus submetidos aos diferentes tratamentos com medicação adicionada à ração.

Tabela 6 – Índices de desempenho zootécnico do *Piaractus mesopotamicus* alimentados durante sete dias com ração contendo praziquantel, levamisol e diflubenzuron.

Tratamentos	Consumo %PV/dia*	Peso inicial(g)	Peso final(g)	GPD*	Biomassa ganha(g)	TCA*
T-0	2,3	42,6	55,2	1,8	350	1,32
T-1	1,6	45	50,7	0,8	159	1,94
T-2	1,3	40,5	46,5	0,85	172	1,4
T-3	1,5	44	47,8	0,54	100	2,8
T-4	1,4	52,2	58,0	0,82	160	1,65
T-5	1,2	41,5	49,4	1,12	220	1,08
T-6	1,3	54,5	60,5	0,86	170	1,51
T-7	1,4	47,2	52,9	0,81	160	1,71
T-8	1,3	48,2	55,3	1,01	208	1,25
T-9	1,7	51,9	57,0	0,72	146	2,23
T-10	1,9	46,3	53,8	1,1	210	1,8
T-11	1,1	45,7	50,1	0,62	130	1,65
T-12	1,5	43,1	51,9	1,25	250	1,2
T-13	1,8	44,2	53,2	1,3	250	1,41
T-14	1,5	43,5	48,9	0,8	150	1,98
T-15	2,2	46,5	58,4	1,7	330	1,28
T-16	1,2	52,5	57,8	0,75	140	1,67
T-17	2,3	41,5	53,7	1,74	343	1,3
T-18	1,8	47,5	55,5	1,14	220	1,59

*PV=peso vivo, TCA=taxa de conversão alimentar, GPD=ganho de peso diário.

De acordo com FURUYA (1998) *P. mesopotamicus* jovens criados em viveiros e alimentados com ração granulada de boa qualidade, apresentaram desempenho semelhante ao observado neste trabalho. No tratamento zero (controle) ocorreu a melhor porcentagem de consumo entre os tratamentos, com os princípios ativos. No entanto, valores próximos a este foram notados nos tratamentos 10, 13, 15, 17 e 18. Nos demais tratamentos o crescimento dos peixes manteve-se constante até o último dia de arraçoamento.

A utilização de agentes antiparasitários na ração para o controle de parasitos altera o paladar da ração (ONAKA et al, 1999). Realmente, o consumo de alimento nos grupos tratados foi menor (Tabela 6). Contudo nos resultados deste trabalho os peixes mantiveram-se em bom crescimento durante o período experimental. Então pressupõem-se que mesmo com a diminuição do consumo, o que foi consumido pelos peixes, foi suficiente para eliminar o crustáceo *D. carvalhoi* com o uso de diflubenzuron na ração na dose de 0,935 a 0,968 e 1237 a 1291mg/Kg. Esse achado corrobora os resultados de FUJIMOTO et al. (1999) que demonstraram eficácia de 100% do diflubenzuron no controle do mesmo parasito em piaçuçs, *Leporinus macrocephalus*, submetidos a banhos na concentração de 0,5 a 1 mg/L de água com exposição única ao princípio ativo, durante 24 horas. Dados similares foram obtidos por SCHALCH et al, (2005) que utilizou 2,0 mg/L, em três exposições de 30 minutos de duração a intervalos de 24 horas, com a mesma espécie de peixe e o mesmo parasito.

Os resultados observados neste trabalho, de acordo com a análise estatística e a eficácia terapêutica do praziquantel e do levamisol não permitem indicá-los no tratamento de monogenóides. Entretanto, da associação do praziquantel com diflubenzuron (0,952 e 1243mg/Kg de ração) se observou eficácia próxima aos 90%, atendendo as exigências da Secretaria da Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura (MAPA) para o registro de anti-parasitários para bovinos.(Portaria 48 de 12/05/1997). No entanto, para peixes ainda não foi proposta nenhuma legislação para o uso de tais drogas para controlar enfermidades em pisciculturas.

As observações da literatura sobre a ação anti parasitária de drogas utilizadas em criação de peixes estão relacionadas a espécies de países de clima temperado, prejudicando a discussão dos resultados ora encontrados. KIM e CHOI, (1998) testaram a eficácia do mebendazol e bithionol adicionados em peletes de ração e administrados via oral contra as formas larvais e adultas do *Microcotyle sebastis*. Este monogenóide é causador de grande mortalidade em *Sebastes schelegeli* jovens, principalmente no verão, quando a temperatura da na água se eleva. Os resultados foram significativos com a utilização de 100 e 200mg/Kg de ração, durante 10 e 20 dias, sendo que neste último, observou-se maior redução no número de parasitos. Segundo PIRONET e JONES, (2000) peixes de cativeiro normalmente desenvolvem infecção causada por monogenóides resultando em hiperplasia eptelial das lamelas branquiais. Estes autores constataram dificuldades em realizar a terapêutica contra esta doença no

ambiente de criação, devido a baixa eficácia das drogas e alto nível de estresse dos peixes. Todavia observaram boa eficácia usando $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de praziquantel em banhos de 30 minutos, ressaltando a importância da inclusão deste produto em dietas para peixes infestados por monogenóides (*Haliotrema abaddon*). Os autores recomendam este fármaco por agir especificamente contra plathelminthos e por ser insolúvel em água.

Utilizando 2 mg l^{-1} de praziquantel por trinta horas na forma de banhos STEPHENS et al (2003) observaram efetividade ($p < 0,05$) em *Glaucosoma hebraicum* infectado contra *H. abaddon*. Estes trabalhos, no entanto, representam parasitos e peixes criados em ambiente salino e os resultados podem ser altamente contraditórios quando comparado às condições de criação em água doce e em clima tropical, como no presente ensaio.

Neste trabalho, os tratamentos com praziquantel e levamisole simples e composto, adicionados em ração, apresentaram baixa eficiência contra *A. penilabiatu*s. Constatou-se, por meio do HPLC, a presença dos princípios ativos devidamente consumidos pelos peixes.

O levamisol é considerado como anti-helmíntico de amplo espectro, com atividade contra diversos tricostrongilídeos, strongilídeos e helmintos pulmonares e vasculares, nas formas adultas e jovens. Pode ser aplicado pelas vias oral, subcutânea, intramuscular e dérmica, sendo rapidamente absorvido e excretado rapidamente pela urina e fezes (LAMMLER e GIESSEN, 1977). O praziquantel em doses relativamente baixas exerce elevada atividade contra cestóides e todas as tênias. Neste ensaio tentou-se associar os benefícios destes dois fármacos na busca de melhor eficácia contra os helmintos monogenóides, objetivo que não foi alcançado.

Uma explicação é que tanto o praziquantel quanto o levamisol são solúveis em água. Desta maneira parte dos princípios ativos contidos na ração poderiam ter se lixiviado (LAMMLER e GIESSEN, 1977). Mas o contrário foi afirmado por PIRONET e JONES, (2000), pois embora a lixiviação possa ocorrer, o diflubenzuron teve alta eficácia com solubilidade em água a 20 a 25°C de 0,1 mg/L. Além disso, as drogas foram ministradas na ração e a solubilidade ou não em água parece desprovida de importância. No momento de cada refeição os peixes em poucos segundos (10) consumiam quase toda a ração fornecida.

Outro ponto que pode ter prejudicado a eficácia dos tratamentos é o hábito alimentar onívoro da espécie de peixe ora utilizada. No momento da digestão ocorre ação de ácido

clorídrico permitindo o abaixamento do pH da ingesta do estômago para melhor ação da pepsina (FURUYA, 1998). De modo que no trato gastrintestinal o pH varia de 1 a 10. Desta forma, a maioria dos medicamentos, na dependência de serem ácidos fracos ou bases, pode se dissociar intensamente e atravessar mais ou menos a fase lipídica das barreiras mucosas gastrintestinais, permitindo sua absorção no estômago ou intestino (LAMMLER e GIESSEN, 1977).

De acordo com ERDAL (1997) a principal vantagem da administração oral de medicamentos é que não há dispersão do produto na água, sendo os metabólitos predominantemente excretados juntamente com as fezes, depositados no fundo para sedimentação e degradação. Outro benefício do tratamento oral é a eliminação dos banhos terapêuticos, possibilitando o uso em grandes gaiolas em águas abertas e o uso de pequena quantidade de produto adicionado à ração, quando comparado a banhos terapêuticos, diminuindo com isso os custos da profilaxia ou terapia.

De acordo com a portaria MAPA, para registro de antiparasitários para bovinos sua eficácia não pode ser inferior a 90%. Não há até o momento legislação para o uso de tais produtos antiparasitários em peixes ou outros organismos aquáticos ou qualquer referência sobre eventuais prejuízos causados ao ambiente pelo uso de tais drogas. Não se deve esquecer que no ambiente aquático estão presentes organismos como o zooplâncton que, entre outras funções de importância, fazem parte da cadeia alimentar de várias espécies de peixes e realizam metamorfose. Portanto estes sofreriam também os efeitos do diflubenzuron. Embora considerada uma droga relativamente atóxica, seu uso deve ser parcimonioso e fora do ambiente de criação, preferencialmente em quarentenários, evitando-se a entrada tanto da droga quanto dos parasitos no ambiente da criação (TONGUTHAI, 1997). Desta forma, os resultados deste ensaio permitem recomendar o uso do diflubenzuron para o controle de *D. carvalhoi* em peixes em ambientes especiais.

CONCLUSÕES

A utilização do diflubenzuron associado ou não ao levamisol e praziquantel na ração foi eficaz no controle de *D. carvalhoi* podendo ser indicado o seu emprego terapêutico.

Não foi observada eficácia terapêutica adequada quando se utilizou o levamisol, praziquantel e diflubenzuron simples ou associados no controle de *A. penilabiatus* não sendo indicados para tal fim.

O tratamento com praziquantel associado ao diflubenzuron (0,952 e 1243mg/Kg de ração) apresentou eficácia adequada até os três dias pós-tratamento, chegando próxima a 90% na última colheita, contra *A. penilabiatus*.

REFERÊNCIAS

- BAUER, O. N.; KARIMOV, S. B. Patterns of parasitic infections of fishes in a water body with constant temperature. *J Fish Biol.*, v. 36, p. 1-8, 1990.
- CASTAGNOLLI, N. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, 1992.
- CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. In: MORAES, F.R; MARTINS, M.L. *Condições pré-disponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004, cap.3, p. 343-386.
- ERDAL, J.I. New drug treatment hits sealice when they are most vulnerable. *Fish farm. Int*, v.24, n. 2, vp. 1997.
- FUJIMOTO, R. Y. ; MARTINS, M. L. ; MORAES, F. R. ; ONAKA, E. M. ; SILVA, C. A. H. Utilização do diflubenzuron no controle de crustáceos parasitos de piauçu, *Leporinus macrocephalus* Garavelo & Britski, 1988. Efeitos parasiticidas e nos parâmetros hematológicos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 11º, 1999, Salvador - BH. Anais.... Salvador, 1999. p. 133.
- HIRAZAWA, N; OSHIMA, S; MITSUBOSHI, T; HATA, K. The anthelmintic effect of medium-chain fatty acids against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*: evaluation of doses of caprylic acid at different water temperatures. *Aquaculture*, v. 195, p. 211–223, 2001.
- KIM, K. H; CHOI, E. S. Treatment of *Microcotyle sebastis* Monogenea on the gills of cultured rockfish *Sebastes schlegelii* with oral administration of mebendazole and bithionol. *Aquaculture*. v. 167, p. 115–121,1998.
- FURUYA, W. M. *Nutrição de peixes – Atualização em piscicultura de água doce – módulo – III*, Maringá, 1998.
- LAMMLER, G; GIESSEN, D. Agentes Antiparasitários. In: FRIMMER, M; LÄMMLER , G. *Farmacologia e Toxicologia em Veterinária*. Guanabara Koogan, 1977, cap.5, p.59-68.
- LITTLE, T.M.; HILLS, F.J. *Agricultural experimentations desings and analysis*, New York: Wiley, 1978.
- MEYER, F.P. Seasonal fluctuations in the incidence of disease on fish farms. In a symposium on diseases of fishes and shellfishes. Special Publication. *American Fisheries Society*, v.5, p.21–29, 1970.

- ONAKA, E. M; SCHALCH, S.H.C; MARTINS M L; MORAES F. R. Adição de sulfóxido de albendazole e praziquantel na ração de pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887: Efeitos sobre helmintos monogenóides parasitos de brânquias e em parâmetros hematológicos, In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA XI, 1999, Salvador. Anais... Salvador, 1999. p. 185.
- OSTRENSKY, A. BOEGER, W. *Fundamentos e técnicas de manejo. Piscicultura*, 1998.
- PELLITERO, P. A. Enfermidades producidas por parasitos en peces, In: MONTEROS J.E.; LABARTA, U. *Patología en acuicultura*. Madrid: Mundi-Prensa Libros, 1988, p. 215-316.
- PIRONET, F.N; JONES, J.B. Treatments for ectoparasites and diseases in captive Western Australian dhufish. *Aquacult.*, v.8, p. 349 – 361, 2000.
- PRETTI, C; SOLDANI, G; COGNETTI-VARRIALE, A. M; MONNI, G; MEUCCI, V; INTORRE, L. Efficacy and safety of azamethiphos for the treatment of pseudodactylogyrosis in the European eel. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, v. 25, p.155–157, 2002.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. *et al.* Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v. 14, n. 2, p. 329-339, 1997.
- REDMAN, C.A., ROBERTSON, A.P., FALLON, P.G., MODHA, J., KUSEL, J.R., DOENHOFF, M.J., MARTIN, R.J. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol. Today*, v.12, p. 14–20, 1996.
- RHODE, K. *Ecology of marine parasites*. CAB International, wallingford, U.K, 1993.
- SAS INSTITUTE INCORPORATION. *The SAS-System for Windows release 8.2* (software). Cary, 1999-2001.
- SCHALCH, H. C. S; BELO, M. A. A; SOARES, V. E; MORAES, J. R. E; MORAES, F.R. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (crustacea: branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (osteichthyes: characidae) naturalmente infectados. *Acta Sci.Anim.Sci*, v.27, n.2, p.297-302, 2005.
- SINGHAL, R.N.; SWARN, J.; DAVIES, R.W. Chemotherapy of six ectoparasitic diseases of cultured fish. *Aquaculture*, v.54, p.165- 171, 1986.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. *Limnologia Aplicada à Aqüicultura*. Jaboticabal: FUNEP, 1995.
- STEPHENS, F.J; CLEARY, J.J; JENKINS, G; JONES, J.B; RAIDAL, S.R; THOMAS, J.B.

Treatments to control *Haliotrema abaddon* in the West Australian dhufish, *Glaucosoma hebraicum*. *Aquaculture*, v. 215, p. 1– 10, 2003.

STONE, J; SUTHERLAND, I. H; SOMMERVILLE, C; RICHARDS, R.H; VARMA, K.J. Field trials to evaluate the efficacy of emamectin benzoate in the control of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* Krøyer and *Caligus elongates* Nordmann, infestations in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture*, v.186, p. 20 –219, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Fauna parasitária de peixes oriundos de pesque-pague do município de Franca, São Paulo, Brasil. I. Protozoários. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.18(supl), p. 67-79, 2001a.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R; MARTINS, M.L.; KRONKA, R.N. Fauna parasitária de peixes oriundos de pesque-pague do município de Franca, São Paulo, Brasil. II Metazoários. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.18(supl) , p. 81-95, 2001b.

THATCHER,V.E. Amazon Fish Parasites. *Amazoniana*, v.11,n.3/4, p.280-281, 1991.

THATCHER,V.E.; BRITES-NETO, J. Diagnóstico, Prevenção e Tratamento de Enfermidades de Peixes Neo Tropicais de Água Doce . *Revista Brasileira Veterinária*, v.16, n. 3, 1994.

TONGUTHAI, K. Control of Freshwater Fish Parasites: A Southeast Asian Perspective. *International Journal for Parasitology*, v. 27, n. 10, p. 1185-1191, 1997.

Capítulo - III

Contagem diferencial de leucócitos em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) infectados por *Dolops Carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) e *Anacanthorus Penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) tratados com praziquantel, levamisol e diflubenzuron

Differential counts of leukocytes in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) infecteds for *Dolops Carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) and *Anacanthorus Penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) treaty wich praziquantel, levamisole and diflubenzuron

Sergio Henrique Canello Schalch^{1,2} ; Flávio Ruas de Moraes^{1,3}

1 - Unesp-Universidade Estadual Paulista - Centro de Aqüicultura – Jaboticaba I-SP

2 - Pólo Regional Noroeste Paulista-APTA-Pesca e Aqüicultura – Votuporanga - SP

3 - Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal-SP, Brasil. e-mail: fruas@fcav.unesp.br // sschalch@aptaregional.sp.gov.br

Artigo escrito de acordo com as normas da revista Acta Scientiarum

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resultados das concentrações de diflubenzuron, praziquantel e levamisol na ração detectadas por cromatografia líquida (HPLC).....	47
Tabela 2 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de neutrófilos nos grupos controle e tratados.	49
Tabela 3 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de monócitos dos grupos controle e tratados	51
Tabela 4 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de Célula Granulocítica especial nos grupos controle e tratados.....	53
Tabela 5 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de linfócitos nos grupos controle e tratados.....	54

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados os efeitos dos tratamentos, com praziquantel, levamisol e diflubenzuron isoladamente e/ou associados, bem como, o efeito da espoliação causada pelos parasitos *Anacanthorus penilabiatatus* e *Dolops carvalhoi* sobre a porcentagem de leucócitos em *Piaractus mesopotamicus* alimentados com ração peletizada. Em cada caixa de água de 300 litros foram distribuídos 28 peixes, dentro de 19 tratamentos. Amostras de sangue foram tomadas um dia antes e três, sete e 15 dias pós tratamentos, utilizando sete peixes em cada amostragem. O delineamento utilizado foi em parcelas subdivididas no tempo comparando os dias de colheitas e os tratamentos, e teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação das médias. Foram observados aumentos significativos no número de neutrófilos, monócitos e células granulocíticas especiais no grupo controle (um dia antes da aplicação) quando comparado aos demais dias de colheitas. Contrariamente o número de linfócitos aumentou significativamente nos três, sete, e 15 dias pós tratamentos quando comparado ao controle. Aumento significativo ($p < 0,05$) do número de monócitos foi observado nos tratamentos quando utilizado 0,362 e 0,640 mg de levamisol/Kg de ração. Quando associado nas dosagens de 0,184+0,949, 0,380+1237 e 0,436+1291mg/Kg de diflubenzuron na ração, houve aumento significativo no número de linfócitos. A associação destas drogas provocou a eliminação de *D. carvalhoi* reduzindo o estresse com melhora aparente da saúde dos peixes. Naqueles em que o levamisol foi utilizado separado, ocorreu incremento na produção de células sanguíneas de defesa.

Palavras-chave: parasitos, praziquantel, levamisol, diflubenzuron, *Piaractus mesopotamicus*, leucócitos

ABSTRACT

In this work the effects of the treatments with diflubenzuron, praziquantel and levamisole isolated or combined, and the action of the parasites *Anacanthorus penilabiatus* and *Dolops carvalhoi* over the leucocyte percentage in *Piaractus mesopotamicus* were evaluated. The drugs were mixed with the pelets diet and fed for one week. Nineteen trials were made using twenty eight fishes in each watertank of 300 liters. Blood harvest were made one day before and three, seven and 15 days after the food treatment. The results were submitted to a Split Plot in Time analysis comparing days of collection and the treatments. A significant increase was observed in the number of neutrophils, monocytes and special granulocitic cells in the control group (one day before the treatment). The number of lymphocytes increased significantly in the collections 3, 7 and 15 when compared to the control. A significant increase ($p<0,05$) of monocytes was observed in the treatments with levamisole alone in the dosages of 0,362 e 0,640 mg de levamizole/Kg of food. When levamisole was associated with the dosages of 0,184+0,949, 0,380+1237 and 0,436+1291mg/Kg with diflubenzuron a significant increase of lymphocytes occurred. The association of these two drugs resulted in the elimination of *D. carvalhoi*, decreased the stress and improved the health of the fishes. The fishes which utilized levamisole alone presented increment of the production of defense blood cells.

Key-words: parasites, praziquantel, levamisole, diflubenzuron, *Piaractus mesopotamicus*, leucocytes

INTRODUÇÃO

O confinamento de peixes em criações comerciais, inevitavelmente conduz a situações estressantes decorrentes de manejo e de alterações ambientais. Como consequência do estresse, ocorre aumento da susceptibilidade a enfermidades infecciosas e parasitárias devidas ao elevado teor de cortisol circulante. Parasitos protozoários ciliados, metazoários platelmintos da classe Monogenea e artrópodes da classe Crustacea são freqüentes, sendo escassas as informações sobre seus efeitos nas variáveis hematológicas, bem como do uso de anti-parasitários (MORAES e MARTINS, 2004; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004)

Vários autores descrevem as variáveis hematológicas de peixes brasileiros de interesse zootécnico (TAVARES-DIAS et al., 1999; TAVARES-DIAS, 2003; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). A avaliação dos padrões sanguíneos pode fornecer subsídios auxiliares importantes para o diagnóstico e prognóstico de processos infecciosos e anemiantes (ANDERSON, 1974; RANZANI-PAIVA, 1991a, STOSKOPF, 1993; SERPUNIN e LIKHATCHYOVA, 1998; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Da mesma forma distúrbios osmoregulatórios (BOON et al, 1990; DAVIS, 1995; YILDIZ, 1998) contribuem para o diagnóstico de processos infecciosos.

Assim considerando, a literatura descreve as características hematológicas de *Piaractus mesopotamicus*, espécie de interesse econômico na aquicultura brasileira e objeto do presente estudo, em situações consideradas normais (TAVARES-DIAS, 2003; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004), quando submetidos à suplementação com ácido ascórbico (MARTINS et al., 1995), às condições de criação intensiva (RANZANI-PAIVA et al., 1998/1999; TAVARES-DIAS et al., 1999a) e ao parasitismo natural (TAVARES-DIAS et al., 1999b,c). Entretanto explicações para alterações do quadro leucocitário não são possíveis, pois não se conhece completamente as funções de cada célula branca (RANZANI-PAIVA, 1991). Além disso, os resultados são controversos em função das diferentes espécies estudadas, seu comportamento, hábitat e técnica de análise (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Todavia há evidências de que quando portadores de parasitoses, os peixes sofrem aumento do número de células de defesa sanguínea (TAVARES-DIAS, 2000), mas não há indicações dos efeitos de agentes anti-parasitários sobre os parâmetros sanguíneos.

OBJETIVOS

Assim, este ensaio teve como objetivo avaliar o leucograma de *Piaractus mesopotamicus* infestados com *Dolops carvalhoi* e *Anacanthorus penilabiatus* tratados com ração contendo diflubenzurom, levamisol ou praziquantel simples e/ou em associação.

MATERIAL E MÉTODO

Este ensaio foi conduzido no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura (Caunesp) e no laboratório de Ictiopatologia do Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – CPPAR da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, localizado a 21°15'22" Latitude S e 48°18'58" Longitude W, com altitude de 595metros.

Neste ensaio foram utilizados 532 exemplares de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), jovens, com 40 a 100 gramas de peso, oriundos da mesma desova. Todos os peixes foram tratados previamente tratamento prévio com banhos de formalina a 10 ppm por 10 minutos e, posteriormente, com sal (NaCl) por 30 minutos (20 g/L), antes de serem experimentalmente infestados. Um lote inicial de 1400 peixes foi aclimatado em dois tanques de alvenaria de 16m³, durante quinze dias. A seguir os peixes foram divididos ao acaso em 19 caixas d'água de plástico, cada uma com 28 peixes, 300 litros de capacidade de água e fluxo contínuo de água e aeração com auxílio de soprador.

Em seis caixas d'água de 300 litros de capacidade de água foram colocados peixes que serviram como fonte de parasitos adultos, sendo mantidos como colônia. Esses peixes eram da espécie *P. mesopotamicus* e estavam infestados com *D. carvalhoi*. Em cada caixa d'água foram colocados diferentes substratos com o propósito de facilitar a reprodução em “ninhos” deste parasito. Após a eclosão dos ovos, foram adicionados à água organismos fitoplancônicos (algas verdes, *Ankistrodesmus gracilis*, cultivadas pelo Laboratório de Produção e Cultivo de Plâncton, do Caunesp), que serviram de alimento aos náuplios e metanáuplios de vida livre. Este período de crescimento dos parasitos variou de 10 a 50 dias dependendo da temperatura da água. Parte da água foi filtrada diariamente em malha de 75 µm e os elementos retidos foram observados em estereomicroscópio a fim de avaliar a presença de metanáuplios de *D. carvalhoi*. Caso positivo os mesmos parasitos permaneceram nas caixas d'água até atingirem o estágio pré-adulto, assim utilizados para infestar peixes dos grupos do

experimento propriamente dito. Em seguida foi realizada a retirada dos parasitos dos peixes com auxílio de pincel e, após, foi feita a contagem e transferência dos mesmos em 19 recipientes de vidros com capacidade de 500mL, até obter o número necessário para a infestação. A quantidade de parasitos que originaram as infestações não muito severas, foi de 400 em cada caixa d'água.

Para infestações com helmintos *A. penilabiatus* foram utilizados exemplares adultos de *P. mesopotamicus*, oriundos de piscicultura comercial, após prévio exame parasitológico e constatação da infestação. Estes animais foram transportados até o CPPAR e acondicionados junto com os peixes jovens em tanques de alvenaria de 16m³, permanecendo neste local por duas semanas, tempo necessário para a transmissão da enfermidade aos peixes jovens (PELLITERO, 1988); (THATCHER, 1991). Em seguida os peixes capturados e selecionados por tamanho, para se obter a maior homogeneidade do lote e, assim, distribuídos nas caixas d'água para posterior tratamento.

Os peixes foram alimentados com ração basal, à qual foram adicionados os agentes quimioterápicos praziquantel (PZQ), levamisol (LVM) e diflubenzuron (DFB), isoladamente e/ou associados, durante sete dias em formato peletizado. O diflubenzuron utilizado no experimento é encontrado na forma de pó branco (25%) em saco de 0,5 Kg. O praziquantel na mesma forma a 98%, e o levamisol, na forma líquida a 23%. Estes produtos foram adquiridos no mercado.

Os peixes foram divididos em 19 grupos como descrito abaixo para receber tratamento via oral com praziquantel, levamisol ou diflubenzuron ou sua associação para o controle de *A. penibaliatus* e *D. carvalhoi*:

Tratamentos:

- ✓ T-O ⇨ Controle, dieta basal
 - ✓ T-1 ⇨ PZQ 1000mg + 1000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-2 ⇨ PZQ 1000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-3 ⇨ PZQ 2000mg + 1000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-4 ⇨ PZQ 2000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-5 ⇨ LVM 1000mg + 1000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-6 ⇨ LVM 1000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-7 ⇨ LVM 2000mg + 1000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-8 ⇨ LVM 2000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-9 ⇨ DFB 1000mg /Kg dieta basal
 - ✓ T-10 ⇨ DFB 2000mg /Kg dieta basal
 - ✓ T-11 ⇨ LVM 1000mg + 1000mg PZQ/Kg dieta basal
 - ✓ T-12 ⇨ LVM 1000mg + 2000mg PZQ/Kg dieta basal
 - ✓ T-13 ⇨ LVM 2000mg + 1000mg PZQ/Kg dieta basal
 - ✓ T-14 ⇨ LVM 2000mg + 2000mg PZQ/Kg dieta basal
 - ✓ T-15 ⇨ PZQ 1000mg /Kg dieta basal
 - ✓ T-16 ⇨ PZQ 2000mg /Kg dieta basal
 - ✓ T-17 ⇨ LVM 1000mg /Kg dieta basal
 - ✓ T-18 ⇨ LVM 2000mg /Kg dieta basal
- ✓ * Praziquantel, ** Diflubenzuron e *** Levamisol

Para alimentação foi formulada dieta basal contendo 26% de Proteína Bruta e 4150 Kcal de Energia Bruta, à qual foram adicionados os quimioterápicos de acordo com o delineamento proposto. Devido à quantidade relativamente pequena do produto adicionado, foi feita uma pré-mistura com 100g da ração basal antes de se homogeneizar com o restante de cada partida, sendo em seguida peletizada. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia,

durante sete dias, de manhã e à tarde, na proporção diária de até 3% da biomassa, evitando-se sobras.

Diariamente foram monitoradas as variáveis aquáticas como temperatura da água, pH e oxigênio dissolvido. A cada três dias foi determinada a concentração de amônia, incluindo-se o período de tratamento.

Para colheita de sangue os peixes foram capturados e anestesiados por imersão em solução de benzocaína a 0,1g/10L de água. O sangue foi colhido em quatro tempos, sendo de cada caixa d'água, capturados sete peixes antes do tratamento, o mesmo número após três dias, sete e quinze. Após anestesia uma alíquota de sangue foi colhida do vaso caudal com auxílio de seringa plástica contendo anti-coagulante (EDTA a 10%). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sangüíneas coradas pancromicamente pelo método de ROSENFELD (1947), sob microscopia de luz. Os esfregaços sanguíneos foram cobertos pelo corante, por aproximadamente um minuto e, a seguir, misturada água destilada ao corante por sete minutos. Em seguida retirou-se a mistura com água corrente e secada em ambiente.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos ao delineamento em parcelas subdivididas no tempo (Split Plot in Time) e sendo F significativo as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tais análises foram efetuadas utilizando o Software SAS versão 8.2 (SAS, 1999-2001).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

1 -Qualidade da água

A análise do oxigênio dissolvido, potencial hidrogeniônico (pH), temperatura da água e amônia tóxica (NH_3) se manteve dentro da normalidade para a espécie estudada. De acordo com CASTANGNOLLI, (1992), SIPAÚBA-TAVARES, (1995) e OSTRENKY e BOEGER, (1998). Não interferindo, portanto, nos resultados obtidos.

2 - Resultados do HPLC

Tabela 1 - Resultados das concentrações de diflubenzuron, praziquantel e levamisol na ração detectadas por cromatografia líquida (HPLC).

Níveis reais de princípios ativos adicionados nas rações	Níveis de princípios ativos detectados na ração por meio de análise (HPLC)
T-1 ⇒ PZQ 1000mg + 1000mg DFB	T-1 ⇒ PZQ 0,950mg + 0,941mg DFB
T-2 ⇒ PZQ 1000mg + 2000mg DFB	T-2 ⇒ PZQ 0,952mg + 1243mg DFB
T-3 ⇒ PZQ 2000mg + 1000mg DFB	T-3 ⇒ PZQ 1952mg + 0,935mg DFB
T-4 ⇒ PZQ 2000mg + 2000mg DFB	T-4 ⇒ PZQ 2010mg + 1273mg DFB
T-5 ⇒ LVM 1000mg + 1000mg DFB	T-5 ⇒ LVM 0,380mg + 0,949mg DFB
T-6 ⇒ LVM 1000mg + 2000mg DFB	T-6 ⇒ LVM 0,184mg + 1237mg DFB
T-7 ⇒ LVM 2000mg + 1000mg DFB	T-7 ⇒ LVM 0,436mg + 0,968mg DFB
T-8 ⇒ LVM 2000mg + 2000mg DFB	T-8 ⇒ LVM 0,436mg + 1291mg DFB
T-9 ⇒ DFB 1000mg	T-9 ⇒ DFB 0,935mg
T-10 ⇒ DFB 2000mg	T-10 ⇒ DFB 1254mg
T-11 ⇒ LVM 1000mg + 1000mg PZQ	T-11 ⇒ LVM 0,350mg + 0,958mg PZQ
T-12 ⇒ LVM 1000mg + 2000mg PZQ	T-12 ⇒ LVM 0,341mg + 1899mg PZQ
T-13 ⇒ LVM 2000mg + 1000mg PZQ	T-13 ⇒ LVM 0,669mg + 0,922mg PZQ
T-14 ⇒ LVM 2000mg + 2000mg PZQ	T-14 ⇒ LVM 0,438mg + 1152mg PZQ
T-15 ⇒ PZQ 1000mg	T-15 ⇒ PZQ 0,977mg
T-16 ⇒ PZQ 2000mg	T-16 ⇒ PZQ 1964mg
T-17 ⇒ LVM 1000mg	T-17 ⇒ LVM 0,362mg
T-18 ⇒ LVM 2000mg	T-18 ⇒ LVM 0,640mg

O levamisol líquido pode ter se perdido no momento de sua inclusão na ração devido aos jatos, utilizados sobre ela, ou seja, parte incorporada à ração e o restante evaporado. A diminuição da dosagem do levamisol, tanto na maior quanto na menor, mais da metade se perdeu. Mesmo com esta diminuição foi demonstrado neste ensaio que os peixes que receberam levamisol na maior concentração (0,669) e menor (0,184mg/Kg de ração) apresentaram aumento na quantidade de leucócitos circulantes.

3 - Exposição da análise estatística da contagem diferencial de leucócitos

Tabela 2 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de neutrófilos nos grupos controle e tratados, nos períodos de colheitas -1, +3,+7 e +15 dias.

GRUPO	Número médio/ Dias pós - tratamento			
	-1	3	7	15
1	8,86 ^{ABC} _a	3,86 ^B _{bc}	5,86 ^{AB} _{ab}	1,71 ^A _c
2	4,43 ^{CDE} _a	2,57 ^B _a	3,14 ^{AB} _a	2,00 ^A _a
3	3,57 ^{CDE} _{bc}	9,57 ^A _a	6,57 ^A _{ab}	1,71 ^A _c
4	10,86 ^{AB} _a	3,43 ^B _b	4,57 ^{AB} _b	3,00 ^A _b
5	2,57 ^{DE} _{ab}	1,43 ^B _b	6,29 ^{AB} _{ab}	1,29 ^A _b
6	3,57 ^{CDE} _a	4,29 ^{AB} _a	3,57 ^{AB} _a	1,86 ^A _a
7	5,57 ^{BCDE} _a	3,14 ^B _{ab}	3,43 ^{AB} _{ab}	0,86 ^A _b
8	8,86 ^{ABC} _a	3,71 ^B _b	4,86 ^{AB} _b	3,00 ^A _b
9	11,00 ^A _a	2,43 ^B _c	6,43 ^{AB} _b	1,57 ^A _c
10	7,57 ^{ABCD} _a	2,57 ^B _b	4,57 ^{AB} _{ab}	1,43 ^A _b
11	6,57 ^{ABCDE} _a	2,86 ^B _{ab}	5,71 ^{AB} _{ab}	2,00 ^A _b
12	2,14 ^E _a	3,43 ^B _a	1,57 ^{AB} _a	0,43 ^A _a
13	1,71 ^E _a	3,71 ^B _a	1,14 ^B _a	2,29 ^A _a
14	2,43 ^{DE} _a	2,43 ^B _a	3,86 ^{AB} _a	1,86 ^A _a
15	3,29 ^{DE} _a	2,43 ^B _a	1,71 ^{AB} _a	2,00 ^A _a
16	3,86 ^{CDE} _a	0,86 ^B _a	2,86 ^{AB} _a	3,43 ^A _a
17	3,57 ^{CDE} _a	1,00 ^B _a	2,57 ^{AB} _a	3,86 ^A _a
18	2,57 ^{DE} _a	2,43 ^B _a	2,00 ^{AB} _a	2,43 ^A _a

** : Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Pela análise da Tabela 2, observa-se que os valores médios de neutrófilos dos tratamentos 4, 8, 9 foram significativamente mais elevados quando comparados com os resultados obtidos no sangue colhido três, sete e 15 dias após os tratamentos. Nos grupos 12 e 13 ocorreram diferenças significativas quando comparados a alguns tratamentos, contudo, resumiu-se apenas a primeira colheita realizada. No tratamento 10, os valores médios foram menores ($p<0,05$) do que o controle, quando comparados aos dias três e quinze. Nos

tratamentos 1, 7 e 11 as médias diferiram em relação ao controle 15 dias pós-tratamento. Este decréscimo no número de células em relação ao controle talvez possa ser causado pela ação das substâncias adicionadas na ração, pois os tratamentos eliminaram os parasitos diminuindo a agressão, tornando-se menos necessária a presença de maior número de neutrófilos na circulação. Essas células têm como função a atividade fagocítica de importância na defesa contra infecções (VALE et al 2002), inclusive citotóxica em *Oncorhynchus mykiss* (SASAKI et al, 2002).

Os peixes possuem mecanismos de defesa não específicos e específicos. Este último requer período de tempo mais longo para a síntese de anticorpos e ativação de células específicas (ANDERSON e JENEY, 1992). Já mecanismos de defesa não específicos são representados basicamente pela inflamação local, cuja principal característica é o acúmulo de leucócitos no tecido invadido. Os casos de resposta inflamatória aguda são caracterizados por neutrofilia e monocitose no sangue e, acúmulo de neutrófilos e macrófagos no local da injúria ou infecção (ROBERTS, 1981; SECOMBES, 1996). Em peixes, a neutrofilia inicia-se uma hora após os estímulos inflamatórios e comumente atinge um pico com 48 horas (SECOMBES, 1996).

Tabela 3 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de monócitos dos grupos controle e tratados

GRUPO	Número médio/ Dias pós - tratamento			
	-1	3	7	15
1	4,71 ^{CD} _a	8,00 ^{ABC} _a	5,57 ^{AB} _a	4,00 ^B _a
2	8,43 ^{ABCD} _a	7,29 ^{ABC} _{ab}	2,86 ^{AB} _b	5,86 ^{AB} _{ab}
3	6,29 ^{CD} _{ab}	10,00 ^{AB} _a	6,71 ^{AB} _{ab}	4,43 ^{AB} _b
4	10,29 ^{ABC} _{ab}	12,43 ^A _a	6,29 ^{AB} _{bc}	5,14 ^{AB} _c
5	9,43 ^{ABC} _a	5,00 ^{BC} _{ab}	5,86 ^{AB} _{ab}	4,00 ^B _b
6	13,29 ^{AB} _a	8,00 ^{ABC} _b	6,71 ^{AB} _b	5,57 ^{AB} _b
7	8,71 ^{ABCD} _a	8,86 ^{ABC} _a	4,57 ^{AB} _{ab}	3,00 ^B _b
8	10,86 ^{ABC} _a	4,71 ^{BC} _b	8,00 ^{AB} _{ab}	4,00 ^B _b
9	14,43 ^A _a	3,29 ^{BC} _c	8,43 ^{AB} _b	4,00 ^B _{bc}
10	14,43 ^A _a	3,43 ^{BC} _b	6,43 ^{AB} _b	3,43 ^B _b
11	10,57 ^{ABC} _a	6,14 ^{ABC} _{ab}	9,29 ^A _a	3,86 ^B _b
12	4,86 ^{CD} _a	4,43 ^{BC} _a	2,29 ^B _a	4,14 ^B _a
13	8,29 ^{ABCD} _a	8,00 ^{ABC} _a	5,71 ^{AB} _a	6,00 ^{AB} _a
14	8,43 ^{ABCD} _a	2,86 ^C _b	4,14 ^{AB} _{ab}	5,57 ^{AB} _{ab}
15	8,00 ^{ABCD} _a	4,86 ^{BC} _a	4,71 ^{AB} _a	6,29 ^{AB} _a
16	5,71 ^{CD} _a	3,14 ^{BC} _a	7,86 ^{AB} _a	7,57 ^{AB} _a
17	6,86 ^{BCD} _{ab}	4,14 ^{BC} _b	4,14 ^{AB} _b	11,29 ^A _a
18	2,00 ^D _b	7,00 ^{ABC} _{ab}	4,71 ^{AB} _{ab}	9,00 ^{AB} _a

**: Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey (P>0,05).

Na Tabela 3 observam-se os valores médios de monócitos e diferenças significativas entre os tratamentos e os dias de colheita. Os valores médios dos tratamentos 6, 9 e 10, foram menores em relação ao controle nas três colheitas realizadas. É possível que os tratamentos tenham afetado o número destas células durante o período em que foi realizado. Resultado semelhante foi verificado nos tratamentos 5 e 11, com diminuição no número de células do controle para o dia + 15.

Cotariamente ao observado anteriormente, o tratamento 18 apresentou aumento no número de monócitos em relação ao controle. O mesmo aumento significativo foi verificado no tratamento 17 em relação aos dias + 3 e + sete de colheitas, fato que pode ser explicado pela ação imunoestimulante do levamisol adicionado à ração. De acordo com (ISPIR e DÖRÜCI, 2005) houve aumento da atividade fagocítica de neutrófilos e monócitos com a aplicação de injeções intra-peritoniais (5 mg Kg^{-1}) de levamisol em *Oncorhynchus mykiss*. Além da atividade fagocítica, os monócitos possuem habilidade citotóxica não específica em *Spaurus aurata* e em *Cyprinus carpio* (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Tabela 4 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de Célula Granulocítica especial dos grupos controle e tratados.

GRUPO	Número médio/ Dias pós - tratamento			
	-1	3	7	15
1	10,86 ^{BCD} _{ab}	13,00 ^{AB} _a	7,57 ^A _b	11,71 ^A _{ab}
2	11,29 ^{BCD} _a	4,29 ^C _b	2,29 ^A _b	1,00 ^B _b
3	9,00 ^{CDE} _a	5,57 ^C _{ab}	0,57 ^A _b	0,29 ^B _b
4	12,29 ^{BC} _a	2,71 ^C _b	0,71 ^A _b	1,14 ^B _b
5	8,29 ^{CDE} _a	3,71 ^C _{ab}	1,71 ^A _b	2,00 ^B _b
6	17,57 ^{AB} _a	5,29 ^C _b	1,71 ^A _b	0,43 ^B _b
7	4,86 ^{DEF} _a	4,57 ^C _a	1,57 ^A _a	0,86 ^B _a
8	5,57 ^{CDEF} _b	13,71 ^A _a	3,14 ^A _b	0,57 ^B _b
9	6,29 ^{CDEF} _{ab}	8,71 ^{ABC} _a	2,29 ^A _{bc}	0,43 ^B _c
10	5,71 ^{CDEF} _a	6,57 ^{ABC} _a	2,29 ^A _{ab}	0,29 ^B _b
11	21,71 ^A _a	3,86 ^C _b	0,71 ^A _b	0,14 ^B _b
12	2,86 ^{EF} _a	2,14 ^C _a	1,57 ^A _a	0,57 ^B _a
13	4,14 ^{DEF} _a	1,86 ^C _a	4,57 ^A _a	1,29 ^B _a
14	0,71 ^F _a	4,86 ^C _a	1,43 ^A _a	1,00 ^B _a
15	7,29 ^{CDEF} _a	3,86 ^C _{ab}	1,29 ^A _b	0,71 ^B _b
16	6,29 ^{CDEF} _{ab}	6,43 ^{BC} _a	2,14 ^A _{ab}	1,00 ^B _b
17	1,86 ^{EF} _a	3,86 ^C _a	2,43 ^A _a	0,14 ^B _a
18	3,00 ^{EF} _a	5,14 ^C _a	3,14 ^A _a	0,57 ^B _a

**: Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey (P>0,05).

Observa-se na Tabela 4 que ocorre decréscimo no número médio de células granulocíticas especiais. Nos tratamentos 6 e 11 houve diminuição significativa no número no dia menos 1 para os dias + 3 + 7 e + 15. No tratamento 3, houve decréscimo significativo no número dessas células nos dias + 7 e + 15 em relação ao controle dia menos 1. Apenas no tratamento 1 houve aumento significativo nos dias + 3 e + 15 quando comparado aos demais tratamentos, não refletindo nos demais tratamentos fato de pouca importância no contexto geral das respostas celulares obtidas. O aumento no número desta célula pode ser atribuído à ação espoliante do crustáceo *D. carvalhoi* que, com seu aparelho bucal dotado de ganchos,

causa lesão mecânica e estresse ao hospedeiro. (THATCHER e BRITES-NETO, 1994). Com a morte desses crustáceos houve diminuição da agressão do hospedeiro e a conseqüente, diminuição no número desta célula na circulação para a grande maioria dos tratamentos.

Tabela 5 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de linfócitos dos grupos controle e tratados.

GRUPO	Número médio/ Dias pós - tratamento			
	-1	3	7	15
1	74,86 ^{BCDEF} _a	74,86 ^{BC} _a	81,00 ^A _a	82,57 ^A _a
2	75,71 ^{BCDEF} _b	83,86 ^{ABC} _{ab}	91,71 ^A _a	91,14 ^A _a
3	76,29 ^{BCDEF} _{bc}	72,43 ^C _c	86,14 ^A _{ab}	93,57 ^A _a
4	64,71 ^{FG} _c	76,71 ^{ABC} _b	88,43 ^A _a	88,43 ^A _a
5	76,71 ^{BCDEF} _b	88,71 ^{AB} _a	86,00 ^A _{ab}	92,71 ^A _a
6	65,43 ^{EFG} _b	82,43 ^{ABC} _a	88,00 ^A _a	92,14 ^A _a
7	79,43 ^{ABCDE} _b	83,43 ^{ABC} _{ab}	90,43 ^A _a	49,00 ^B _c
8	72,57 ^{CDEFG} _c	77,86 ^{ABC} _{bc}	84,00 ^A _{ab}	92,43 ^A _a
9	66,00 ^{EFG} _c	85,57 ^{ABC} _{ab}	82,86 ^A _b	93,86 ^A _a
10	69,00 ^{DEFG} _b	85,86 ^{ABC} _a	87,86 ^A _a	94,86 ^A _a
11	58,43 ^G _b	86,57 ^{ABC} _a	84,71 ^A _a	94,00 ^A _a
12	89,00 ^{AB} _a	88,71 ^{AB} _a	94,43 ^A _a	94,86 ^A _a
13	84,14 ^{ABC} _a	86,43 ^{ABC} _a	88,57 ^A _a	90,43 ^A _a
14	88,00 ^{AB} _a	88,86 ^{AB} _a	88,57 ^A _a	91,57 ^A _a
15	79,29 ^{ABCDE} _b	88,29 ^{AB} _{ab}	92,14 ^A _a	91,00 ^A _a
16	83,00 ^{ABCD} _a	89,57 ^A _a	87,14 ^A _a	88,00 ^A _a
17	87,71 ^{AB} _a	90,71 ^A _a	90,71 ^A _a	84,71 ^A _a
18	92,43 ^A _a	85,43 ^{ABC} _a	89,86 ^A _a	88,00 ^A _a

**: Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey (P>0,05).

Os resultados apresentados nesta Tabela 5 parecem controversos, pois, nos tratamentos de 4 a 11 houve aumento significativo no número de linfócitos nos dias três, sete e 15 quando

comparado ao controle (dia menos 1). A maior parte dos resultados de significância estatística (tratamentos 5, 6, 7 e 8) foi da adição do levamisol com diflubenzuron. Os tratamentos 9 e 10 da adição somente do diflubenzuron na ração, o tratamento 11 da associação do levamisol com praziquantel, e o tratamento 4 da associação do praziquantel e diflubenzuron. A associação do diflubenzuron ao levamisol eliminou o crustáceo *D. carvalhoi*. A eficácia destes tratamentos aliado à ação estimulante do levamisol pode levar à melhora da condição imune do *P. mesopotamicus*, como verificado pela elevação constante do número de linfócitos nas colheitas dos dias três, sete e 15. De acordo com BOON et al. (1990), citado por TAVARES-DIAS (2000), tanto em mamíferos como em peixes, os processos infecciosos ativam o sistema imune celular, alterando o percentual de células de defesa orgânica circulantes. Por esta razão é preciso identificar e quantificar as células sanguíneas de defesa orgânica em cada espécie de teleosteo para melhor compreensão da sua participação nos processos infecciosos. Segundo RUANE et al., (2000), em *Oncorhynchus mykiss* mantidas em confinamento e infectadas por 1500 formas imaturas do crustáceo *Lepeophtheirus salmonis*, ocorre o aumento do número de linfócitos após seis horas de exposição, reduzindo-se após 24 horas. Os níveis séricos de lisozima também foram diminuindo com a exposição do parasito. Os autores concluem que ocorre diminuição da resistência do hospedeiro frente a outras infecções.

O levamisol parece atuar em todas as fases da resposta imune, interferindo no metabolismo dos nucleotídeos cíclicos, aumentando a quimiotaxia e a atividade fagocitária, bem como a exacerbação das reações de hipersensibilidade tardia. Em peixes, provoca aumento do número de leucócitos circulantes, da atividade fagocitária de leucócitos, da atividade mieloperoxidase de neutrófilos e dos níveis séricos de lisozima (SIWICHI et al., 1994). JENEY et al. (1994) observaram a resposta imune de *Dicentrarchus labrax* submetidos a banhos em concentrações de 1,0mg e 5,0 mg levamisol/L de água durante 30 minutos, verificando aumento do número de leucócitos e da atividade fagocitária. De acordo com ISPIR e DÖRÜCI, 2005 houve aumento da atividade fagocítica de neutrófilos e monócitos com a aplicação de injeções intra-peritoniais (5 mg Kg⁻¹) de levamisol em *O. mykiss* durante quatro colheitas de sangue. Os resultados mais significativos com níveis de significância variado ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) ocorreram aos 10 e 14 dias, respectivamente, após a aplicação da substância.

Os resultados deste trabalho revelam que houve alterações no número de células de defesa sanguínea, passíveis de serem atribuídas tanto à ação dos parasitos como dos medicamentos fornecidos. Pode-se inferir que em princípio, os tratamentos foram eficazes. Contudo os peixes apresentaram variações celulares importantes, e em particular os peixes que ingeriram levamisol aumentando a presença dos diferentes tipos celulares na corrente circulatória.

CONCLUSÕES

Os peixes que receberam levamisol apresentaram aumento do número de monócitos e linfócitos circulantes.

Nos peixes tratados em que houve eliminação do parasito *D. carvalhoi*, ocorreu decréscimo no número de neutrófilos e de células granulocíticas especiais.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D.P. *Fish Immunology*. TFH Neptune City, New Jersey. 1974.
- ANDERSON, D.P.; JENEY, G. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.34, p.379-389, 1992.
- BOON, J.H; CANNAERTS, V. M. H; AUGUSTIJN, H; MACHIELS, M. A. M; DE CHARLEROY, D.; OLLEVIER, F. The effect of different infection levels with infective larvae of *Anguillicola crassus* on haematological parameters of european eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture*, v.87, p. 243 -253, 1990.
- CASTAGNOLLI, N. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, 1992.
- CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. In: MORAES, F.R; MARTINS, M.L. *Condições pré-disponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004, cap.3, p. 343-386.
- DAVIS, S.W. Values for Selected Serum Analytes during Experimental *Ichthyophthirius multifiliis* Infection of Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*; v. 7, p. 262–264, 1995.
- EIRAS, J.C. *Elementos de ictioparasitologia*. Porto, Portugal: Fundação Eng. Antônio de Almeida, 1994.
- ISPIR, Ü.; DÖRÜCI, M. Study on the Effects of Levamisole on the Immune System of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turk J. Vet. Anim. Sci*, v. 29, p. 1169 - 1176, 2005.
- JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D. Effects of immunostimulation on the non-specific immune response of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. In: ABSTRACT FROM THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AQUATIC ANIMAL HEALTH, Seattle: 1994, p. 4-8.
- OSTRENSKY, A. BOEGER, W. *Fundamentos e técnicas de manejo. Piscicultura*, 1998.
- MARTINS, M.L.; CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S.M.F.; URBINATI, E.C. Influência de diferentes níveis de vitamina C na ração sobre os parâmetros hematológicos de alevinos da *Piaractus mesopotamicus holmberg*, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Rev. Bras. Zool.*, v. 12, n. 3, p. 609-618, 1995.

- PELLITERO, P. A. Enfermidades producidas por parasitos en peces, In: MONTEROS J.E.; LABARTA, U. (Eds.). *Patología en acuicultura*. Madrid: Mundi-Prensa Libros, 1988, p. 215-316.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. Características sangüíneas da pirapitinga do sul, *Brycon* sp., sob condições experimentais de criação intensiva. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 28, p. 141-153, 1991.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SALLES, F.A.; EIRAS, J.C.; EIRAS, A.C.; ISHIKAWA, C.M. & ALEXANDRINO, A.C. Análise hematológica de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações d.e piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. *Bol. Inst. Pesca*, v.25, p. 77-83, 1998/1999.
- ROBERTS, R. J. *Patologia de los Peces*, Madri: Ediciones Mundi Prensa, 1981.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May- Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*, v.20, p. 329-334, 1947.
- RUANE, N. M; NOLAN, D. T; ROTLLANT, J; COSTELLOE, J; WENDELAAR BONGA, S. E. Experimental exposure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to the infective stages of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) influences the physiological response to an acute stressor . *Fish & Shellfish Immunology*, v.10, p. 451–463, 2000.
- SASAKI, Y; MAITA, M; OKAMOTO, N. Rainbow trout neutrophils are responsible for non-specific cytotoxicity. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 12, n. 3, p. 243-252, 2002.
- SAS Institute.SAS User's Guide: *Estatistics*. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA,1989-1996.
- SECOMBES, C.J. *The fish immune system - the nonspecific immune system: celular defenses*. Academic Press. USA. 1996, p.63-103.
- SERPUNIN, G. G; LIKHATCHYOVA, O. A. Use of Ichthyohaematological Studies in Ecological Monitoring of the reservoirs. *Acta vet. Brno*, v.67, p. 339-345, 1998.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. *Limnologia Aplicada à Aqüicultura*. Jaboticabal: FUNEP, 1995.
- SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and immunopathology*. v.41, p.123-139, 1994.

- SOUZA, V.N.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; KRONKA, S.N. Metodologia de infecção experimental e grau de susceptibilidade do híbrido “tambacu” e *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 a quatro inóculos de trofozoítos de *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 18, n. 3, p. 803-811, 2001.
- STOSKOPF, M. K. *Fish medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993.
- THATCHER, V.E.; BRITES-NETO, J.B. Diagnóstico, Prevenção e Tratamento de Enfermidades de Peixes Neo Tropicais de Água Doce. *Revista Brasileira Veterinária*, v.16, n. 3, 1994.
- TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R.A.; GIOLI, L.D.; FAUSTINO, C.D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) em policultivo intensivo. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.16, n.2, p. 423-431, 1999a.
- TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R.; PERECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavello e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae) em policultivo intensivo. *Acta Sci*, v. 21, n.2, p. 337-342, 1999b.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L. & KRONKA, S.N. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes: Characidae) with *Argulus* sp (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *Rev. Bras. Zool.*, v. 16, p. 553-555, 1999c.
- TAVARES-DIAS, M. *Estudos parasitológico e hematológico em peixes oriundos de pesque-pagues do município de Franca, SP*, 2000. Dissertação (Mestrado) - Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal -SP. 2000.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em pesque-pague de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal*, v.19, p.103-110, 2003.
- TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R. Hematological characteristics of Brazilian Teleosts. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo State, Brazil, *B. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 109 - 115, 2003.

TAVARES-DIAS, M ; MORAES, F.R, *Hematologia de Peixes Telósteos*. 1ª ed – Ribeirão Preto, 2004.

THATCHER,V.E. Amazon Fish Parasites. *Amazoniana*,v.11, n.3/4, p. 280-281, 1991.

VALE A.; AFONSO, A; SILVA, M. T. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 13, n.3, p. 183-198, 2002.

YILDIZ, H. Y. Effects of experimental infection with *Pseudomonas fluorescens* on different blood parameters in Carp (*Cyprinus Carpio* L.). *Israeli journal of aquaculture-Bamidgeh* , v. 50, n. 2, p. 82-85, 1998.

Capítulo IV

Variáveis eritrocitárias em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887
(Osteichthyes: Characidae) infectados por *Dolops Carvalhoi*
(Crustacea: Branchiura) e *Anacanthorus Penilabiatus* (Monogenea:
Dactylogyridae) tratados com praziquantel, levamisol e diflubenzuron

Variable eritrocitary in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes:
Characidae) infected for *Dolops Carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) and
Anacanthorus Penilabiatus (Monogenea: Dactylogyridae) treaty wick
praziquantel, levamisole and diflubenzuron.

Sergio Henrique Canello Schalch^{1,2} ; Flávio Ruas De Moraes^{1,3}

1 - Unesp-Universidade Estadual Paulista - Centro de Aqüicultura – Jaboticaba I-SP

2 - Pólo Regional Noroeste Paulista-APTA-Pesca e Aqüicultura – Votuporanga - SP

3 - Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal-SP,
Brasil. e-mail: fruas@fcav.unesp.br // sschalch@aptaregional.sp.gov.br

Artigo escrito de acordo com as normas da revista *Acta Scientiarum*

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resultados das concentrações de diflubenzuron, praziquantel e levamisol na ração detectadas por cromatografia líquida (HPLC).....	71
Tabela 2 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de hematócrito (%)	73
Tabela 3 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de hemoglobina (g/dL)	75
Tabela 4 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM %)	77
Tabela 5 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens da hemoglobina corpuscular média (VCM μ^3)	78
Tabela 6 – Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	79

RESUMO

Este trabalho avaliou eventuais alterações no quadro hematológico de *Piaractus mesopotamicus* infectados por *Anacanthorus penilabiatatus* e *Dolops carvalhoi* tratados com praziquantel, levamisol e diflubenzuron, isolados ou associados, via oral, contidos em ração. Em cada caixa de água de 300 litros foram distribuídos 28 peixes. O experimento foi conduzido em quatro colheitas de sangue, sendo um dia antes e três, sete e 15 dias depois dos tratamentos. Os peixes foram alimentados com ração contendo as referidas drogas durante sete dias. Os resultados foram submetidos ao delineamento em parcela subdividida no tempo, comparando os dias de coleta e os tratamentos. Foram observados aumentos significativos ($p < 0,05$) de hematócrito, concentração de hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), eritrócitos e volume corpúscular médio (VCM), quando comparado ao grupo controle (dia menos 1). Decréscimo significativo de VCM foi observado somente em dois tratamentos em relação ao controle. A variação dos parâmetros analisados pode estar associada ao estímulo estressante de manejo, ação espoliativa dos parasitos e ao uso de drogas anti-helmínticas. Esses fatores podem ter provocado adaptações nas respostas fisiológicas e retornado aos valores próximos do controle no último dia de análise.

Palavras-chave: parasitos, praziquantel, levamisol, diflubenzuron, *Piaractus mesopotamicus*, hematologia

ABSTRACT

This search evaluated alterations in the hematological traits of *Piaractus mesopotamicus*, infected by *Anacanthorus penilabiatus* and *Dolops carvalhoi* treated with diflubenzuron, praziquantel and levamisole placed in the diet. The experiment was conducted in 19 tanks of 300 liters containing every one, twenty eight fish. Four harvests of seven fishes each were made, one day before and three, seven and 15 days after the treatments for parasite evaluation. The food with the drugs was offered to the fishes for seven days. The results were analysed as Split Plot in Time for comparison of the treatments blood values. The results show a significant ($p < 0,05$) increase in the hematocrit, hemoglobin concentration, meddle corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), meddle corpuscular volume (MCV) and erythrocytes when compared to the control (one day before the application). A significant decrease of MCV was observed in only two treatments in relation to the control. The increase of this variable may be associated with a stress condition induced by the parasites action and the drugs use. These factors may have induced a physiological adaptation of the fishes which returned to levels near the control values in the last analyses.

Key-words: parasites, praziquantel, levamisole, diflubenzuron, *P. mesopotamicus*, hematology

INTRODUÇÃO

No Brasil a enfermidade causada por monogenóides é importante em piscicultura e, usualmente ocorrem infestações maciças como reflexo de manejo sanitário deficiente e da deterioração do ambiente aquático, graças à poluentes, excesso de matéria orgânica, baixa concentração de oxigênio dissolvido, altos teores de amônia e/ou nitritos, alterações do pH ideal e outras (MORAES e MARTINS, 2004). Os helmintos monogenóides alimentam-se das camadas superficiais do epitélio da superfície corporal e brânquias, causando processo irritativo. Os peixes tornam-se anoréxicos, apresentam-se desorientados chocando-se contra as paredes do tanque, com subidas e descidas repentinas à superfície da água (MORAES e MARTINS, 2004).

Estudos tentam caracterizar as variáveis hematológicas de peixes brasileiros de interesse zootécnico, como o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, (TAVARES DIAS et al., 1999). Como o que ocorre em mamíferos, os peixes portadores de infecção podem apresentar neutrofilia com linfopenia relativa. Sendo assim, o emprego de formulações medicamentosas pode, em alguns casos, imunodeprimir os animais, alterando seu quadro hematológico. Neste contexto, *Oncorhynchus masou*, parasitados por *Argulus coregoni* apresentaram decréscimo na contagem de eritrócitos e leucócitos e nas taxas de hemoglobina e hematócrito (SHIMURA et al., 1983). THATCHER e BRITES - NETO (1994) relataram infestações maciças por *Argulus* sp. em peixes jovens ou alevinos levando-os à morte. A principal ação patogênica reside no fato de que os argulídeos ao perfurarem a pele do hospedeiro com suas peças bucais, injetam anticoagulantes e secreções digestivas, ingerindo sangue e células epiteliais. Assim o hábito hematófago do parasito causa anemia enquanto a histofagia provoca lesões do tegumento cutâneo causando inflamação, e em grande parte dos casos, infecções secundárias bacterianas ou micóticas.

A avaliação de parâmetros hematológicos em peixes portadores de infecção parasitária não demonstrou diferenças significativas nas variáveis eritocitrárias em *M. platanus* infectados com monogenóides e *Trichodina* sp. (RANZANI-PAIVA et al 1997), em *P. mesopotamicus* infectados com *Argulus* sp. (TAVARES-DIAS et al 1999), assim como não foram observadas variações no eritrograma quando infectados por *Anacanthorus penilabiatus* (TAVARES-DIAS, 2000; ONAKA et al 2002).

OBJETIVOS

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar possíveis alterações eritrocitárias advindas da espoliação e estresse causados por *D. carvalhoi* e *A. penilabiatus* em *P. mesopotamicus* tratados com quimioterápicos pela via oral, contidos na ração.

MATERIAL E MÉTODO

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura e no laboratório de Ictiopatologia do Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – CPPAR da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Localizado a 21°15'22" Latitude S e 48°18'58" Longitude W, com altitude de 595metros.

Neste ensaio foram utilizados 532 exemplares de pacu *Piaractus mesopotamicus*, jovens de 40 a 100 gramas de peso, oriundos de piscicultura, sendo todos nascidos de mesma desova. Todos os peixes sofreram prévio tratamento com banhos de formalina a 10 ppm e posteriormente sal (NaCl, 20 g/L), antes de serem experimentalmente infestados. Um lote inicial de 1400 peixes foi aclimatado em dois tanques de alvenaria de 16m³, durante quinze dias. Destes, foram selecionados e divididos em 19 caixas d'água de plástico, cada uma com 300 litros de capacidade e com fluxo contínuo de água e aeração com auxílio de soprador. Em cada caixa d'água foram mantidos 28 peixes.

Em seis caixas d'água de 300 litros foram acondicionados espécimes adultos de *P. mesopotamicus* e *L. macrocephalus* que serviram como fonte de parasito adulto. Em cada caixa d'água foram colocados diferentes substratos com o propósito de facilitar a reprodução em ninhos do parasito. Após a eclosão dos ovos, foram adicionados à água organismos fitoplanctônicos, que serviram de alimento de náuplios e metanáuplios de vida livre. Este período de crescimento dos parasitos variou de 10 a 50 dias dependendo da temperatura da água das caixas. Parte da água foi filtrada diariamente em malha de 75 µm e os elementos retidos foram observados em estereomicroscópio a fim de avaliar a presença de metanáuplios de *D. carvalhoi*. Caso positivo, os parasitos permaneceram nas caixas d'água até atingirem o estágio pré-adulto, que foram utilizados como inóculo. Em seguida foi realizada a retirada dos parasitos dos peixes com auxílio de pincel e feita sua contagem e transferência para 19

recipientes de vidros com capacidade de 500mL, até obter o número necessário para a infestação. A quantidade de parasitos que originaram as infestações adequadas foi de 400 espécimes em cada caixa d'água.

Para infestações com helmintos monogenóides foram utilizados exemplares adultos de *P. mesopotamicus*, oriundos de pesque-pagues e/ou pisciculturas comerciais após prévio exame parasitológico. Estes foram transportados até o CPPAR e acondicionados juntamente aos peixes jovens, em tanques de alvenaria de 16m³, permanecendo neste local por duas semanas, tempo necessário para a transmissão da enfermidade aos peixes jovens. Em seguida os peixes foram capturados e selecionados por tamanho para se obter a maior homogeneidade do lote e distribuídos nas caixas d'água para posterior tratamento.

Os tratamentos foram feitos adicionando-se à ração os princípios ativos praziquantel(PZQ), levamisol(LVM) e diflubenzuron(DFB). Os animais foram alimentados com ração peletizada, associados ou não, assim denominados:

Tratamentos:

- ✓ T-O ⇨ Controle, dieta basal
 - ✓ T-1 ⇨ PZQ 1000mg + 1000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-2 ⇨ PZQ 1000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-3 ⇨ PZQ 2000mg + 1000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-4 ⇨ PZQ 2000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-5 ⇨ LVM 1000mg + 1000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-6 ⇨ LVM 1000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-7 ⇨ LVM 2000mg + 1000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-8 ⇨ LVM 2000mg + 2000mg DFB/Kg dieta basal
 - ✓ T-9 ⇨ DFB 1000mg /Kg dieta basal
 - ✓ T-10 ⇨ DFB 2000mg /Kg dieta basal
 - ✓ T-11 ⇨ LVM 1000mg + 1000mg PZQ/Kg dieta basal
 - ✓ T-12 ⇨ LVM 1000mg + 2000mg PZQ/Kg dieta basal
 - ✓ T-13 ⇨ LVM 2000mg + 1000mg PZQ/Kg dieta basal
 - ✓ T-14 ⇨ LVM 2000mg + 2000mg PZQ/Kg dieta basal
 - ✓ T-15 ⇨ PZQ 1000mg /Kg dieta basal
 - ✓ T-16 ⇨ PZQ 2000mg /Kg dieta basal
 - ✓ T-17 ⇨ LVM 1000mg /Kg dieta basal
 - ✓ T-18 ⇨ LVM 2000mg /Kg dieta basal
- ✓ * Praziquantel, ** Diflubenzuron e *** Levamisol

Para alimentação foi formulada a ração basal contendo 26% de PB e 4100 Kcal de EB, na qual foram adicionados os anti-parasitários de acordo com o delineamento proposto. Devido à quantidade relativamente pequena do produto adicionado, foi feita uma pré-mistura com 100g da ração basal antes de se homogeneizar com o restante de cada partida. Após homogeneização a ração foi peletizada. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, de

manhã e à tarde, durante sete dias, na proporção diária de até 3% da biomassa, evitando-se sobras.

Diariamente foram determinadas as variáveis aquáticas como temperatura da água, pH e oxigênio dissolvido. A cada três dias foi determinada a concentração de amônia, incluindo-se o período de tratamento.

Os peixes foram alimentados com ração basal à qual foram adicionados os agentes quimioterápicos, isoladamente ou associados. O diflubenzuron utilizado no experimento é encontrado na forma de pó branco (25%) em saco de 0,5 Kg. O praziquantel em pó (98%), e o levamisol líquido a 23%. Estes produtos foram adquiridos no mercado comercial.

A colheita de sangue foi feita em datas experimentais. De cada caixa d'água foram abatidos um número de sete peixes antes do tratamento, e após três dias, sete dias e quinze dias. Antes do sacrifício dos peixes por comoção cerebral, uma alíquota de sangue foi colhida do vaso caudal com auxílio de seringa plástica contendo anticoagulante (EDTA a 10%). Em seguida o sangue foi transferido para eppendorfes de 1,5mL e conservado em geladeira de isopor.

O hematócrito foi determinado pelas instruções de GONDENFARB et al. (1971) e a determinação da taxa de hemoglobina (Hb) foi calculada seguindo as recomendações de COLLIER (1944). As constantes corpusculares, como o volume corpuscular médio (VCM), e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram calculadas segundo WINTROBE (1934). As análises de eritrócitos como as variáveis acima, foram realizadas em contador automático de células com impressora modelo CC550 série 1414 Selm com diluidor automático modelo DA 500 P6, série 4407 selm.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos ao delineamento em parcela subdividida no tempo (Split Plot in Time), sendo F significativo ao teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação de médias. Tais análises foram efetuadas utilizando o Software SAS versão 8.2 (SAS, 1999-2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 -Qualidade da água

A análise do oxigênio dissolvido, potencial hidrogeniônico (pH), temperatura da água e amônia tóxica (NH_3) se manteve dentro da normalidade para a espécie estudada. De acordo com CASTANGNOLLI, (1992), SIPAÚBA-TAVARES, (1995) e OSTRENKY e BOEGER, (1998). Não interferindo portanto nos resultados obtidos.

2 - Resultados do HPLC

Tabela 1 - Resultados das concentrações de diflubenzuron, praziquantel e levamisol na ração detectadas por cromatografia líquida (HPLC).

Níveis reais de princípios ativos adicionados nas rações	Níveis de princípios ativos detectados na ração por meio de análise (HPLC)
T-1 ⇒ PZQ 1000mg + 1000mg DFB	T-1 ⇒ PZQ 0,950mg + 0,941mg DFB
T-2 ⇒ PZQ 1000mg + 2000mg DFB	T-2 ⇒ PZQ 0,952mg + 1243mg DFB
T-3 ⇒ PZQ 2000mg + 1000mg DFB	T-3 ⇒ PZQ 1952mg + 0,935mg DFB
T-4 ⇒ PZQ 2000mg + 2000mg DFB	T-4 ⇒ PZQ 2010mg + 1273mg DFB
T-5 ⇒ LVM 1000mg + 1000mg DFB	T-5 ⇒ LVM 0,380mg + 0,949mg DFB
T-6 ⇒ LVM 1000mg + 2000mg DFB	T-6 ⇒ LVM 0,184mg + 1237mg DFB
T-7 ⇒ LVM 2000mg + 1000mg DFB	T-7 ⇒ LVM 0,436mg + 0,968mg DFB
T-8 ⇒ LVM 2000mg + 2000mg DFB	T-8 ⇒ LVM 0,436mg + 1291mg DFB
T-9 ⇒ DFB 1000mg	T-9 ⇒ DFB 0,935mg
T-10 ⇒ DFB 2000mg	T-10 ⇒ DFB 1254mg
T-11 ⇒ LVM 1000mg + 1000mg PZQ	T-11 ⇒ LVM 0,350mg + 0,958mg PZQ
T-12 ⇒ LVM 1000mg + 2000mg PZQ	T-12 ⇒ LVM 0,341mg + 1899mg PZQ
T-13 ⇒ LVM 2000mg + 1000mg PZQ	T-13 ⇒ LVM 0,669mg + 0,922mg PZQ
T-14 ⇒ LVM 2000mg + 2000mg PZQ	T-14 ⇒ LVM 0,438mg + 1152mg PZQ
T-15 ⇒ PZQ 1000mg	T-15 ⇒ PZQ 0,977mg
T-16 ⇒ PZQ 2000mg	T-16 ⇒ PZQ 1964mg
T-17 ⇒ LVM 1000mg	T-17 ⇒ LVM 0,362mg
T-18 ⇒ LVM 2000mg	T-18 ⇒ LVM 0,640mg

As doses preconizadas no delineamento experimental estavam presentes nos tratamentos em que se utilizou o praziquantel somente em um tratamento (14) houve redução da dose. Nos tratamentos em que se utilizou-se o diflubenzuron, somente a dose maior teve perdas sem ter influenciado no controle de *D. carvalhoi*. Enquanto as doses de levamisol foram menores que a metade, provavelmente pelo fato do produto ser líquido e provavelmente ter evaporado no momento de sua inclusão na ração.

3 - Parâmetros hematológicos e exposição da análise estatística

Tabela 2 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de hematócrito(%)

GRUPO	Número médio/ Dias pós - tratamento			
	-1	3	7	15
1	27,90 ^A _{ab}	28,97 ^A _{ab}	28,24 ^A _a	28,33 ^{ABCDE} _a
2	29,66 ^A _{ab}	29,86 ^A _{ab}	28,50 ^A _a	26,47 ^{BCDE} _a
3	34,93 ^A _{ab}	30,83 ^A _{ab}	28,44 ^A _b	37,39 ^A _a
4	30,83 ^A _a	27,80 ^A _a	27,19 ^A _a	23,83 ^E _a
5	27,53 ^A _a	23,90 ^A _a	26,84 ^A _a	22,63 ^E _a
6	27,66 ^A _a	25,49 ^A _a	28,06 ^A _a	24,66 ^E _a
7	31,56 ^A _a	25,41 ^A _a	25,60 ^A _a	24,47 ^E _a
8	30,23 ^A _{ab}	32,43 ^A _a	29,90 ^A _{ab}	23,10 ^E _b
9	29,10 ^A _a	27,81 ^A _a	26,57 ^A _a	25,47 ^{CDE} _a
10	31,70 ^A _a	26,91 ^A _a	32,06 ^A _a	25,20 ^{DE} _a
11	35,30 ^A _a	27,54 ^A _a	29,66 ^A _{ab}	28,77 ^{ABCDE} _{ab}
12	32,96 ^A _a	27,44 ^A _a	25,84 ^A _a	31,79 ^{ABCDE} _a
13	32,69 ^A _{ab}	25,37 ^A _b	26,71 ^A _b	36,13 ^{AB} _a
14	34,11 ^A _a	27,83 ^A _{ab}	26,07 ^A _a	30,06 ^{ABCDE} _{ab}
15	29,43 ^A _{ab}	27,34 ^A _b	28,44 ^A _{ab}	35,60 ^{ABCD} _a
16	30,71 ^A _{ab}	27,96 ^A _b	27,80 ^A _b	35,86 ^{ABC} _a
17	31,10 ^A _a	33,60 ^A _a	26,36 ^A _a	26,01 ^{BCDE} _a
18	27,69 ^A _a	29,89 ^A _a	27,77 ^A _a	28,43 ^{ABCDE} _a

**: Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey (P>0,05).

Diferenças significativas foram verificadas na análise da Tabela 2. No tratamento 3 houve elevação do porcentual de hematócrito do dia 15 quando comparado ao dia sete. E nos tratamentos 13 e 16 quando comparado aos dias três e sete. Já para o tratamento 15 este aumento no porcentual ocorreu no dia 15 em relação ao dia três. Somente no tratamento oito

houve decréscimo no dia 3 para o dia 15. Não foram observadas diferenças significativas do hematócrito entre os tratamentos e o grupo controle, desta forma, o parasitismo e os tratamentos alteraram este percentual nos sete dias de experimento voltando às condições hematológicas normais após o término do tratamento e a eliminação dos parasitos.

Desta forma, tanto os parasitos que sobreviveram até três dias de tratamento, quanto os tratamentos posteriores (de três até sete dias) causaram mudanças fisiológicas nos peixes. Quando exposto à situações adversas, o organismo desencadeia um conjunto de respostas fisiológicas que permitem ao organismo adaptar-se ao estímulo estressante, assumindo novo patamar de equilíbrio orgânico. Uma vez cessada a agressão, o organismo volta à condição inicial (MAZEAUD e MAZEAUD, 1981; ROBERTSON et al., 1987). Assim, as diferenças significativas verificadas entre os tratamentos do dia 15 podem estar relacionadas a este fato. Segundo AZEVEDO, et al. (2006), em *Oreochromis niloticus* criadas em sistema de policultivo e parasitadas por *Cichlidogyrus sclerosus*, *Cichlidogyrus* sp, *Trichodina* sp. e *Lamproglana* sp., em baixo índice de parasitismo, os percentuais do hematócrito não alteraram.

Para se alimentarem os parasitos *D. carvalhoi* fixam-se à pele do hospedeiro com seus ganchos, perfuram-na com seu aparelho bucal através do qual, injetam substâncias anti-coagulantes e secreções digestivas e, mudam constantemente de lugar no hospedeiro ampliando, assim, ainda mais o estado de agressão (THATCHER e BRITES-NETO, 1994). Desta forma, a eliminação dos parasitos reduz a intensidade do estímulo agressor promovendo a melhora do bem estar animal. Quando estressados os peixes sofrem redução do apetite com reflexos no ganho de peso (PAOUTSOGLOU et al., 1998) e o aumento dos níveis circulantes de cortisol com a conseqüente depressão da atividade dos mecanismos de defesa orgânica (MAULE et al., 1989; BARTON e IWAMA, 1991; BELO, 2002; BRUM, 2003).

Tabela 3 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de hemoglobina(g/dL).

GRUPO	Número médio/ Dias pós - tratamento			
	-1	3	7	15
1	9,69 ^A _b	9,70 ^A _b	9,97 ^A _{ab}	12,30 ^{BCD} _a
2	9,24 ^A _b	9,20 ^A _b	9,46 ^A _b	12,16 ^{BCD} _a
3	9,39 ^A _b	10,01 ^A _b	9,49 ^A _b	16,90 ^A _a
4	9,93 ^A _a	9,09 ^A _a	10,13 ^A _a	9,49 ^D _a
5	10,47 ^A _a	8,40 ^A _a	9,69 ^A _a	10,66 ^{CD} _a
6	9,89 ^A _a	9,06 ^A _a	9,97 ^A _a	11,37 ^{BCD} _a
7	10,49 ^A _{ab}	8,76 ^A _b	9,41 ^A _{ab}	11,66 ^{BCD} _{ab}
8	11,09 ^A _a	10,97 ^A _a	11,91 ^A _a	9,73 ^D _a
9	11,29 ^A _a	9,43 ^A _a	10,30 ^A _a	9,53 ^D _a
10	10,00 ^A _a	8,96 ^A _a	10,41 ^A _a	9,36 ^D _a
11	10,60 ^A _a	9,40 ^A _a	10,53 ^A _a	9,67 ^D _a
12	9,17 ^A _b	9,07 ^A _b	9,60 ^A _{ab}	11,89 ^{BCD} _{ab}
13	9,17 ^A _b	8,70 ^A _b	10,04 ^A _b	14,01 ^{ABC} _a
14	9,76 ^A _a	9,41 ^A _a	9,94 ^A _a	11,07 ^{BCD} _a
15	10,21 ^A _b	9,90 ^A _b	10,51 ^A _b	13,33 ^{BC} _a
16	9,80 ^A _b	9,27 ^A _b	10,53 ^A _b	14,19 ^{AB} _a
17	10,14 ^A _a	11,34 ^A _a	10,16 ^A _a	9,77 ^D _a
18	9,51 ^A _{ab}	8,21 ^A _b	10,46 ^A _{ab}	10,83 ^{BCD} _{ab}

**: Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey (P>0,05).

Nesta tabela 3 verifica-se que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores de hemoglobina. Nos tratamentos 1, 2, 3, 13, 15 e 16 ocorreu aumento nos valores do dia 15 quando comparado as demais coletas realizadas e ao controle. Estes resultados significativos coincidem com os tratamentos em que foram utilizadas doses de praziquantel simples e associado ao diflubenzuron. O tratamento dois (0,952 mg de praziquantel e 1243mg de diflubenzuron/Kg de ração) destaca-se entre os demais, pelas maiores eficácias no controle de monogênóides e *D. carvalhoi*. Este aumento de hemoglobina pode estar associado ao fim dos

tratamentos e a eliminação dos parasitos tanto das brânquias como da camada eptelial, diminuindo o estresse e a espoliação pelos parasitos, melhorando assim o seu estado geral.

Tabela 4 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de CHCM(%) dos grupos controle e tratados.

GRUPO	Número médio / Dias pós - tratamento			
	-1	3	7	15
1	32,09 ^{A_c}	33,70 ^{AB_{bc}}	36,90 ^{AB_b}	43,93 ^{ABC_a}
2	33,59 ^{A_b}	31,16 ^{AB_b}	33,32 ^{B_b}	45,90 ^{A_a}
3	34,01 ^{A_b}	32,89 ^{AB_b}	33,58 ^{AB_b}	45,31 ^{AB_a}
4	32,47 ^{A_b}	32,76 ^{AB_b}	37,14 ^{AB_{ab}}	39,44 ^{BCD_a}
5	34,74 ^{A_b}	35,02 ^{A_b}	36,03 ^{AB_b}	47,13 ^{A_a}
6	33,92 ^{A_b}	35,52 ^{A_b}	35,59 ^{AB_b}	46,08 ^{A_a}
7	33,09 ^{A_b}	34,48 ^{AB_b}	37,08 ^{AB_b}	47,73 ^{A_a}
8	32,89 ^{A_b}	34,26 ^{AB_b}	39,92 ^{A_a}	41,91 ^{ABCD_a}
9	34,53 ^{A_a}	34,09 ^{AB_a}	38,80 ^{AB_a}	37,44 ^{DE_a}
10	31,43 ^{A_b}	33,59 ^{AB_{ab}}	32,96 ^{B_{ab}}	37,19 ^{DE_a}
11	31,74 ^{A_a}	34,21 ^{AB_a}	35,51 ^{AB_a}	32,92 ^{E_a}
12	32,42 ^{A_b}	33,22 ^{AB_b}	38,54 ^{AB_a}	36,88 ^{DE_{ab}}
13	31,04 ^{A_{ab}}	34,31 ^{AB_{ab}}	37,66 ^{AB_a}	38,74 ^{CDE_a}
14	32,03 ^{A_b}	33,88 ^{AB_{ab}}	38,16 ^{AB_a}	36,31 ^{DE_{ab}}
15	36,96 ^{A_a}	36,20 ^{A_a}	36,79 ^{AB_a}	37,27 ^{DE_a}
16	31,69 ^{A_c}	33,59 ^{AB_{bc}}	38,00 ^{AB_{ab}}	39,03 ^{BCDE_a}
17	32,78 ^{A_b}	33,64 ^{AB_b}	38,84 ^{AB_a}	37,45 ^{DE_{ab}}
18	35,84 ^{A_a}	28,28 ^{B_b}	37,75 ^{AB_a}	38,09 ^{CDE_a}

**: Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P>0,05$).

Verifica-se pela tabela 4 que ocorreram diferenças significativas ($p<0,05$) para os tratamentos de 1 a 8, 10, 16 e 17 quando comparado ao controle. As demais diferenças entre os dias de coleta se resumiram a alterações sanguíneas que ocorrem com o manejo dos peixes. Portanto não podem ser atribuídas somente ao parasitismo e as drogas. Ocorreram diferenças significativas entre os grupos apenas no décimo quinto dia de CHCM. Estes aumentos sugerem melhoras nas condições gerais de saúde.

Tabela 5 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de VCM (μ^3) dos grupos controle e tratados.

GRUPO	Número médio / Dias pós - tratamento			
	-1	3	7	15
1	152,29 ^A _a	154,71 ^{ABC} _a	146,86 ^{CD} _a	149,00 ^B _a
2	151,86 ^A _a	155,43 ^{ABC} _a	150,43 ^{CD} _a	148,14 ^B _a
3	148,00 ^A _a	153,57 ^{ABC} _a	148,86 ^{CD} _a	148,29 ^B _a
4	150,43 ^A _a	151,14 ^{ABC} _a	148,71 ^{CD} _a	147,71 ^B _a
5	149,43 ^A _a	149,43 ^{BC} _a	146,14 ^{CD} _a	150,14 ^B _a
6	152,43 ^A _a	155,29 ^{ABC} _a	148,29 ^{CD} _a	156,14 ^{AB} _a
7	154,43 ^A _a	145,43 ^C _a	147,14 ^{CD} _a	151,29 ^B _a
8	151,86 ^A _a	150,71 ^{ABC} _a	148,00 ^{CD} _a	151,29 ^B _a
9	152,29 ^A _a	154,86 ^{ABC} _a	152,14 ^{CD} _a	153,43 ^{AB} _a
10	154,29 ^A _a	158,00 ^{AB} _a	140,29 ^D _b	150,00 ^B _a
11	156,00 ^A _b	157,71 ^{ABC} _{ab}	155,43 ^{BC} _b	165,57 ^A _a
12	150,00 ^A _a	149,71 ^{BC} _a	146,86 ^{CD} _a	149,29 ^B _a
13	152,43 ^A _a	155,14 ^{ABC} _a	148,14 ^{CD} _a	149,57 ^B _a
14	154,14 ^A _a	149,00 ^{BC} _a	149,43 ^{CD} _a	150,71 ^B _a
15	144,71 ^A _a	151,71 ^{ABC} _a	150,57 ^{CD} _a	148,43 ^B _a
16	147,57 ^A _b	152,43 ^{ABC} _b	173,43 ^A _a	148,43 ^B _b
17	146,43 ^A _b	149,43 ^{BC} _{ab}	156,86 ^{BC} _a	148,43 ^B _{ab}
18	150,71 ^A _b	162,43 ^A _a	165,43 ^{AB} _a	149,43 ^B _b

**: Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P>0,05$).

Na Tabela 5 observam-se poucas diferenças significativas entre os grupos controle e tratado e parasitado. As pequenas alterações ocorridas nos dias de tratamento parecem não ter afetado a saúde dos peixes, pois estavam com aspecto bom com coloração forte e brilhante. As diferenças significativas ($p<0,05$) do VCM para os tratamentos 10, 16 e 18 não se confirmaram na última colheita.

Tabela 6 - Valores médios e resultados da análise de variância para contagens de eritrócitos($\times 10^6/\text{mm}^3$).

GRUPO	Número médio/ Dias pós - tratamento			
	-1	3	7	15
1	2,00 ^A _a	2,02 ^{ABCD} _a	1,87 ^A _a	1,91 ^A _a
2	1,90 ^A _a	1,84 ^{ABCD} _a	1,82 ^A _a	1,92 ^A _a
3	1,90 ^A _a	1,79 ^{ABCD} _a	1,87 ^A _a	2,01 ^A _a
4	1,91 ^A _b	2,52 ^A _a	2,10 ^A _{ab}	1,84 ^A _b
5	1,83 ^A _a	1,61 ^{BCD} _a	2,02 ^A _a	1,60 ^A _a
6	1,83 ^A _a	1,52 ^D _a	1,91 ^A _a	1,64 ^A _a
7	1,89 ^A _a	1,58 ^{CD} _a	2,06 ^A _a	1,75 ^A _a
8	1,74 ^A _{ab}	1,62 ^{BCD} _b	2,33 ^A _a	2,15 ^A _{ab}
9	2,03 ^A _{ab}	1,53 ^D _b	2,16 ^A _a	1,80 ^A _{ab}
10	1,75 ^A _a	1,66 ^{BCD} _a	2,13 ^A _a	1,70 ^A _a
11	2,28 ^A _a	1,68 ^{BCD} _a	2,19 ^A _a	1,75 ^A _a
12	1,91 ^A _a	1,83 ^{ABCD} _a	1,97 ^A _a	1,83 ^A _a
13	1,86 ^A _a	2,11 ^{ABCD} _a	2,02 ^A _a	1,63 ^A _a
14	1,80 ^A _a	2,41 ^{AB} _a	2,03 ^A _a	1,87 ^A _a
15	1,74 ^A _a	1,99 ^{ABCD} _a	1,91 ^A _a	1,81 ^A _a
16	1,89 ^A _a	2,39 ^{ABC} _a	2,19 ^A _a	1,83 ^A _a
17	1,76 ^A _b	2,41 ^{AB} _a	2,16 ^A _{ab}	2,25 ^A _{ab}
18	1,68 ^A _a	1,76 ^{ABCD} _a	1,77 ^A _a	1,83 ^A _a

**: Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P>0,05$).

Os resultados significativos observados nesta Tabela 6 foram encontradas no tratamento 4, sendo foi observado aumento nos valores de eritrócitos no dia três, quando comparado ao controle, e ao dia 15. Para os tratamentos 8 e 9 o aumento foi verificado no dia 7 em relação ao dia 3. E para o tratamento 17, houve significância estatística pela elevação desta variável no dia 3, quando comparado ao controle. Deve-se destacar que todas as

alterações presentes nesta variável sanguínea não foram confirmadas na última colheita, sugerindo que as drogas não prejudicaram os peixes.

De acordo com RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA (2004) estabelecer e definir valores normais (padrão), e decidir o que é normal são problemas básicos em hematologia de peixes. A definição de normalidade pode começar pelo conhecimento da variabilidade interindividual. Uma condição adversa não significa necessariamente uma doença, mas apenas a manifestação da variabilidade biológica e/ou estresse. Segundo LUSKOVÁ (1997) na maior parte dos casos é difícil decidir sobre a causa ou essência da anormalidade.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que os tratamentos com os antiparasitários interferiram na série vermelha. No entanto, não foram detectados prejuízos quanto à possibilidade de processos anemiantes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste experimento revelaram boas perspectivas para o controle do crustáceo *Dolops carvalhoi*.

A princípio a utilização do levamisol era para controlar monogenóides, mas com a análise dos resultados verificou que o seu potencial em proteger a saúde dos peixes pelos mecanismos de defesa celular.

Práticas de manejo profilático podem e devem ser implementadas em projetos de piscicultura, pois o aumento da produção intensiva de peixes necessitará de base sanitária para se desenvolver nos próximos anos.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, T. M. P.; MARTINS, M. L.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R. Haematological and gill responses in parasitized tilapia from valley of Tijucas River, SC, Brazil. *Sci. agric.* v. 63, n.2, p.115-120, 2006.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G.W. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Reveiw on Fish Diseases*, v.1, p. 3-26, 1991.
- BELO, M.A.A. *Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887*, 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, SP, 2002.
- BRUM, C. *A vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em Piaractus mesopotamius Holmberg, 1887 mantidos em diferentes densidades*, 2003. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP, 2003.
- CASTAGNOLLI, N. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, 1992.
- CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. In: MORAES, F.R; MARTINS, M.L. *Condições pré-disponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004, cap. 3, p. 343-386.
- COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, Vancouver, v.50, p.550-552, 1944.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E. & BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory : the microhematocrit determination. *Amer.J. Clin. Path.*, v.56, p. 35-39, 1971.
- LUSKOVÁ, V. Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes. *Scientiarum naturalium Acad. Scientiarum Bohemicae BRNO*, 31Nova Series 1-70, 1997.
- MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F. *Adrenergic Response to Fish Stress* in. In: PICKERING, A.D. *Stress and Fish*. New York; Academic Press, 1981, p. 49-75.
- MAULE, A.G; TRIPP, R.A; KAATTARI, S.L; SCHRECK C.B. Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Endocrinology*, v. 120, n. 1, p.135-142, 1989.

- ONAKA, E. M; MARTINS, M.L; MORAES, F.R. Efeitos da infestação por *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Anacanthorinae) e do tratamento com Mebendazol e Levamisol sobre o hemograma de pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887(Osteichthyes: Characidae) In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 7 e ENCONTRO LATINO – AMERICANO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS , 3., 2002, Foz do Iguaçu. Anais....Foz do Iguaçu, 2002. p. 40.
- OSTRENSKY, A. BOEGER, W. *Fundamentos e técnicas de manejo. Piscicultura*, 1998.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; CAMPOS, B.E.S.; EIRAS, A.C. Haematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.14, p.329-339, 1997.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.) *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Editora Varela, 2004. p. 89-120.
- ROBERTSON, L. THOMAS, P; ARNOLD, C. R ; TRANT, J. M. Plasma Cortisol and Secondary Stress Responses of Red Drum to Handling, Transport, Rearing Density, and a Disease Outbreak. Texas Marine Science Institute, Port Aransas, Texas USA. *The Progressive Fish-Culturist* , v. 49, p.1–12, 1987.
- ROBERTSON, S.J., MARTIN, R.J., Levamisole-activated single-channel currents from muscle of the nematode parasites *Ascaris suum*. *Br. J. Pharmacol.*, v. 108, p. 170–178, 1993.
- SAS Institute.SAS User's Guide: *Estatistics*. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA,1989-1996.
- SHIMURA, S. Seasonal occurrence, sex ratio and site preference of *Argulus coregoni* Thorell (Crustacea:Branchiura parasitic on cultured freshwater salmonids in Japan. *Parasitology*, v. 86, n. 3, p. 537-552, 1983.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. *Limnologia Aplicada à Aqüicultura*. Jaboticabal: FUNEP, 1995.
- PAPOUTSOGLU, S.E., TZIHA, G., VRETTOS, X., ATHANASIOU, A. Effects of stocking density on behaviour and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. *Aquacultural Engineering*, v. 18, p. 44 -135, 1998.
- TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R.A.; GIOLI, L.D.; FAUSTINO, C.D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros.II- Parâmetro sanguíneo do *Piaractus mesopotamicus*, em policultivo intensivo. *Rev. Bras. Zool.*, v. 16, p. 423-431, 1999.

TAVARES-DIAS, M. *Estudos parasitológico e hematológico em peixes oriundos de pescapagues do município de Franca, SP*, 2000. Dissertação (Mestrado) - Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal -SP. 2000.

THATCHER,V.E.; NETO, J.B. Diagnóstico, Prevenção e Tratamento de Enfermidades de Peixes Neo Tropicais de Água Doce . *Revista Brasileira Veterinária*, v.16, n. 3, 1994.

WINTROBE, M.M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. *Folia Haemat.*, v. 51, p. 32-49, 1934.

ANEXOS



Figura 1 – Vista do local de realização do experimento.



Figura 2 – Ração peletizada contendo os princípios ativos: levamisol, praziquantel e diflubenzuron e/ou sua associação.



Figura 3 - Biometria em *Piaractus mesopotamicus*, comprimento total (centímetros e peso).



Figura 4 - Retirada das brânquias de *P. mesopotamicus*



Figura 5 – *P. mesopotamicus* intensamente parasitado pelo crustáceo *Dolops carvalhoi*



Figura 6 – Detalhe do parasito *D. carvalhoi*



Figura 7 – Espécies de monogenóides fixados nos filamentos branquiais de *P. mesopotamicus*.

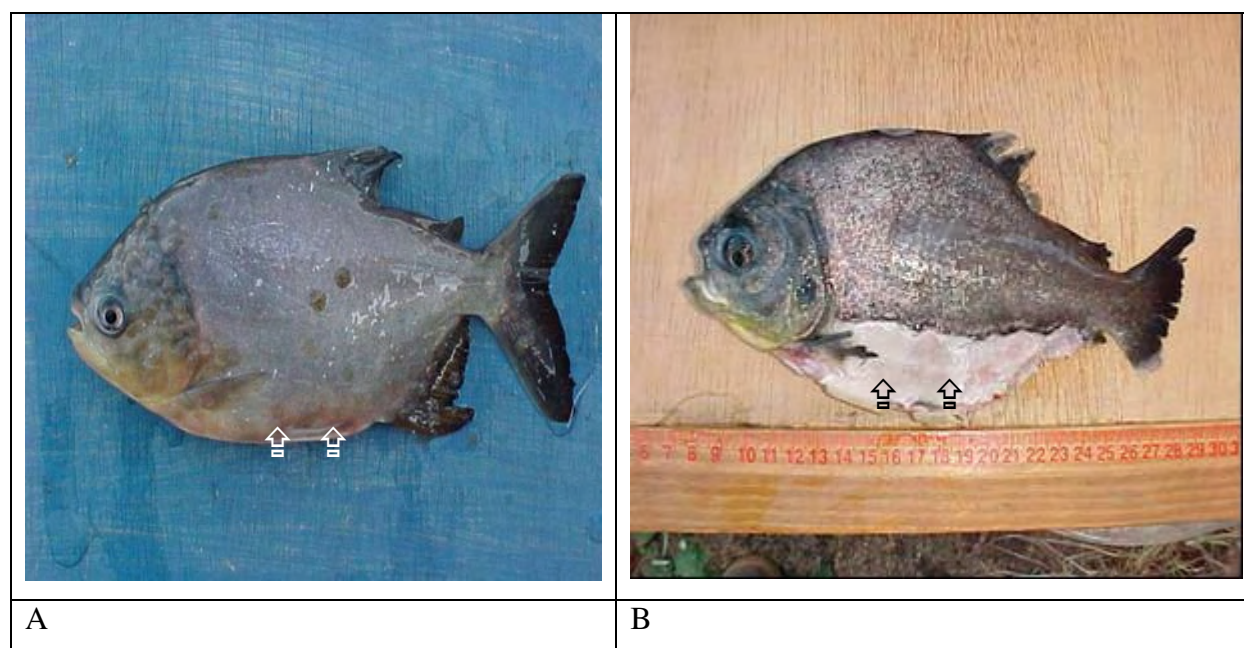


Figura 8 – Em (A) hemorragia na região ventral de *P. mesopotamicus* parasitado por *D. carvalhoi*; em (B) perda da integridade da pele e nadadeiras.

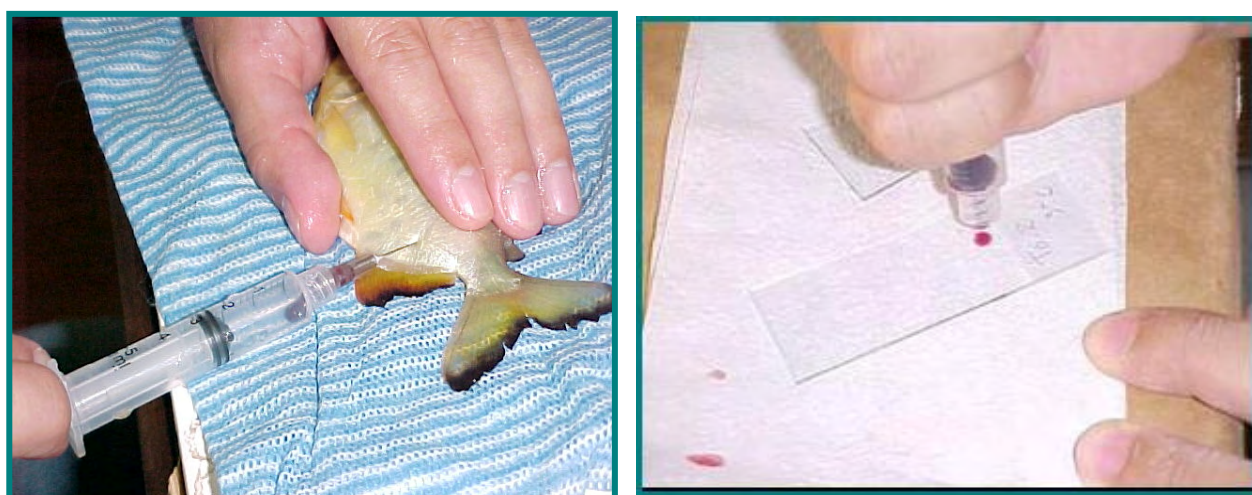


Figura 9 – Punção da veia caudal, para retirada de alíquota de sangue do *P. mesopotâmicus*.

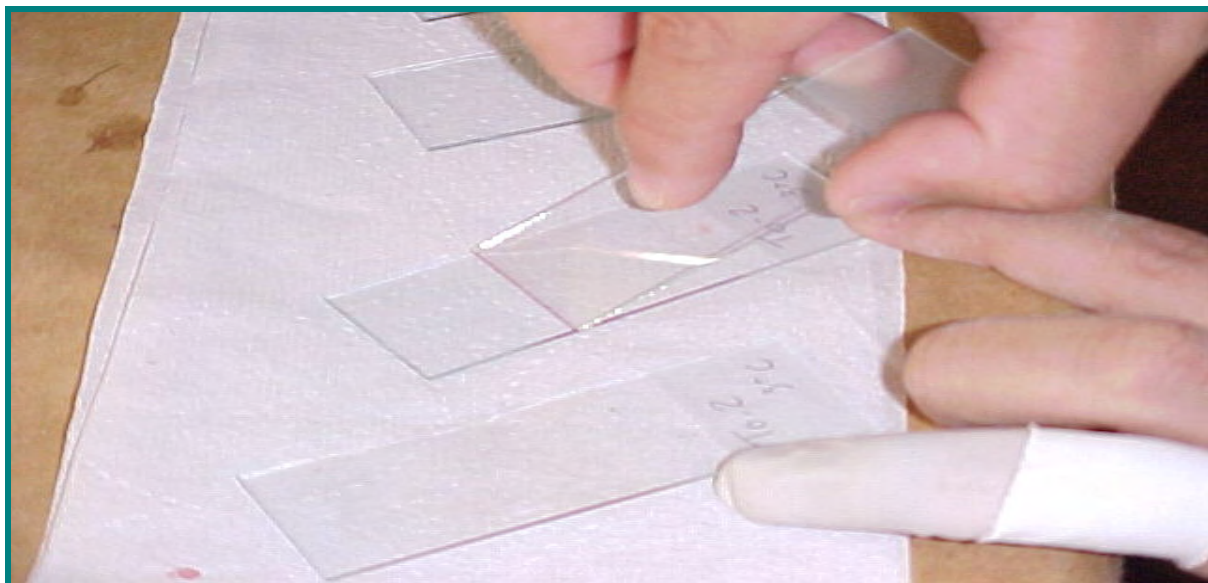


Figura 10 - Extensões sanguíneas

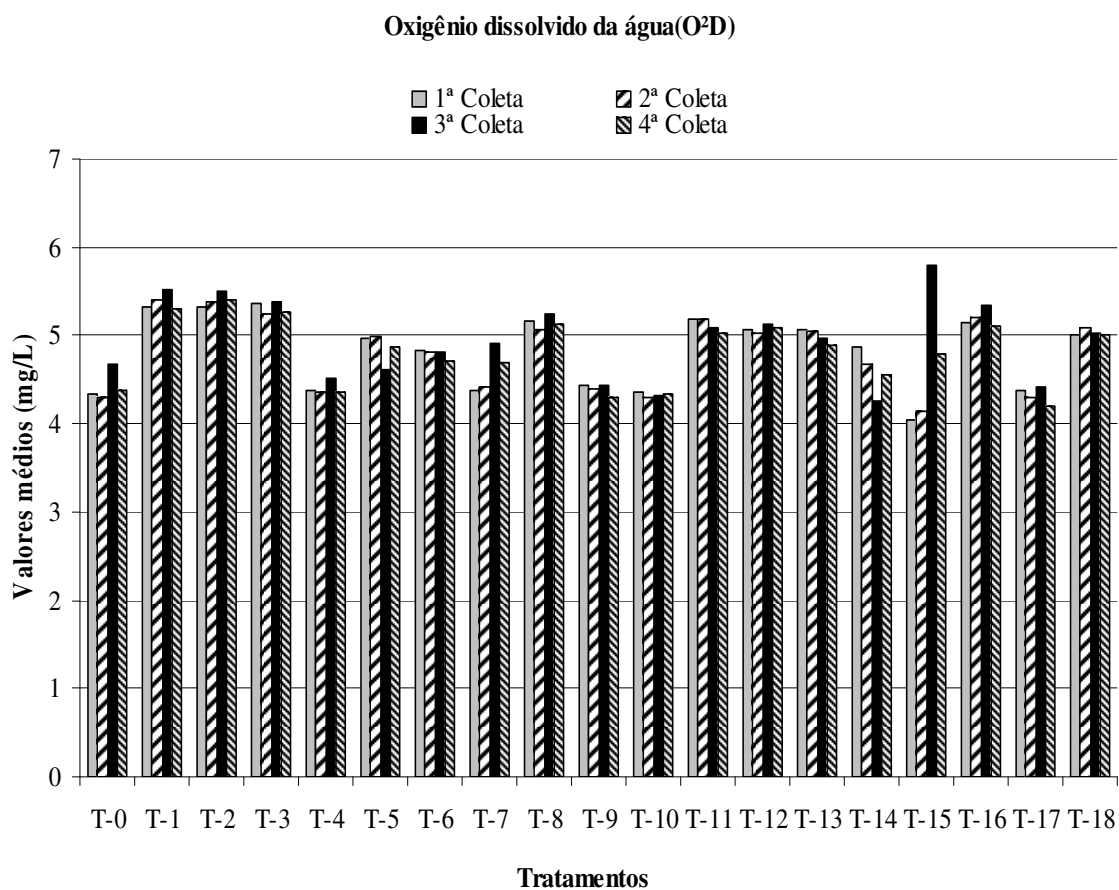


Figura 11 – Valores médios do oxigênio dissolvido da água das caixas com os respectivos tratamentos.

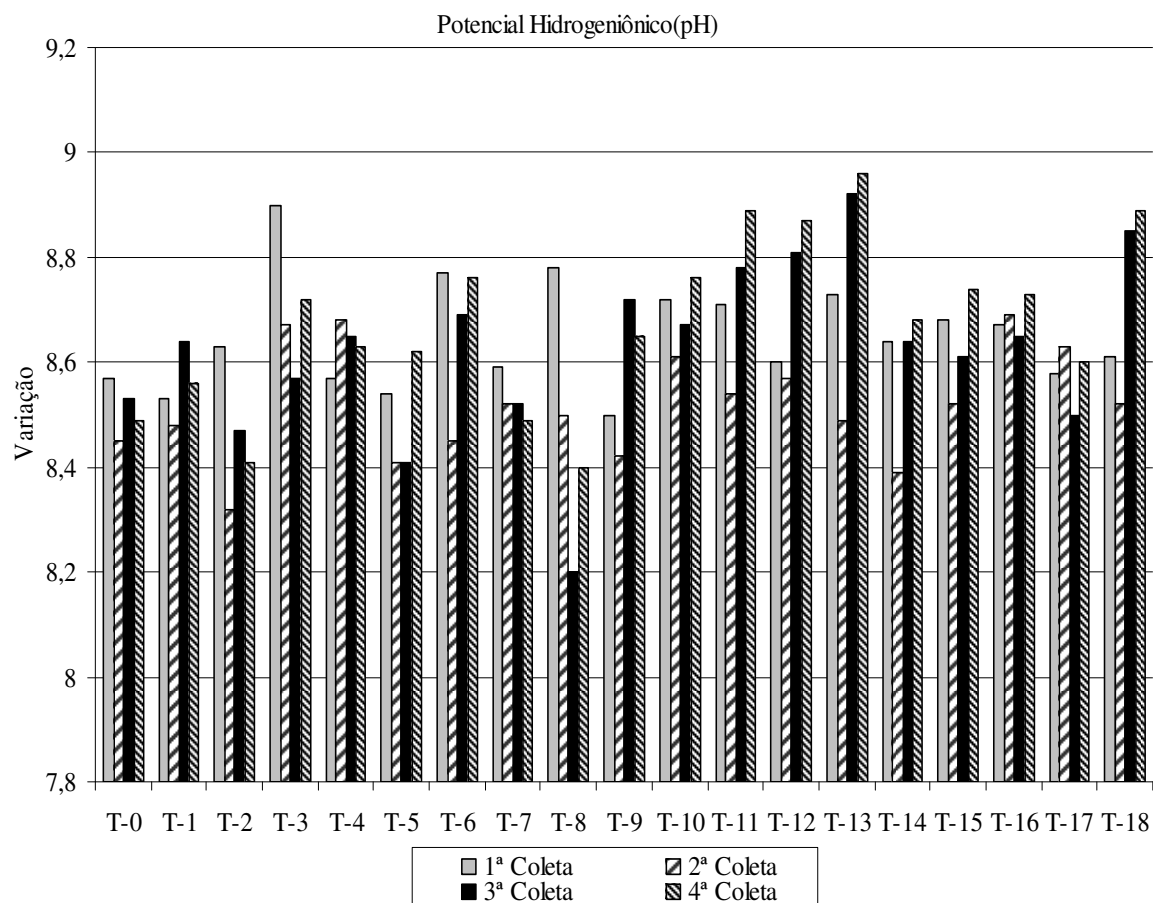


Figura 12 – Resultados da análise da água pH (potencial hidrogeniônico)

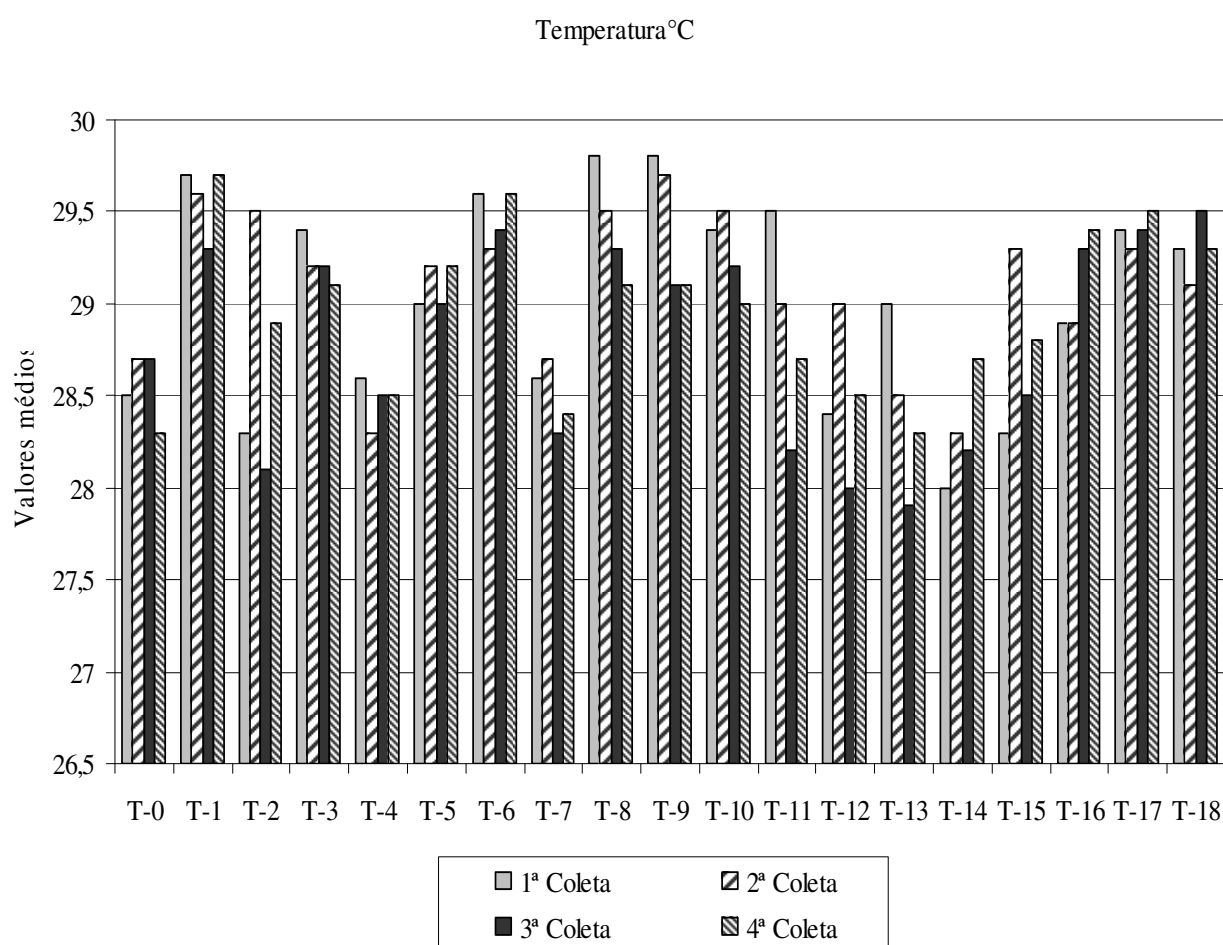


Figura 13 – Valores médios da temperatura da água das caixas

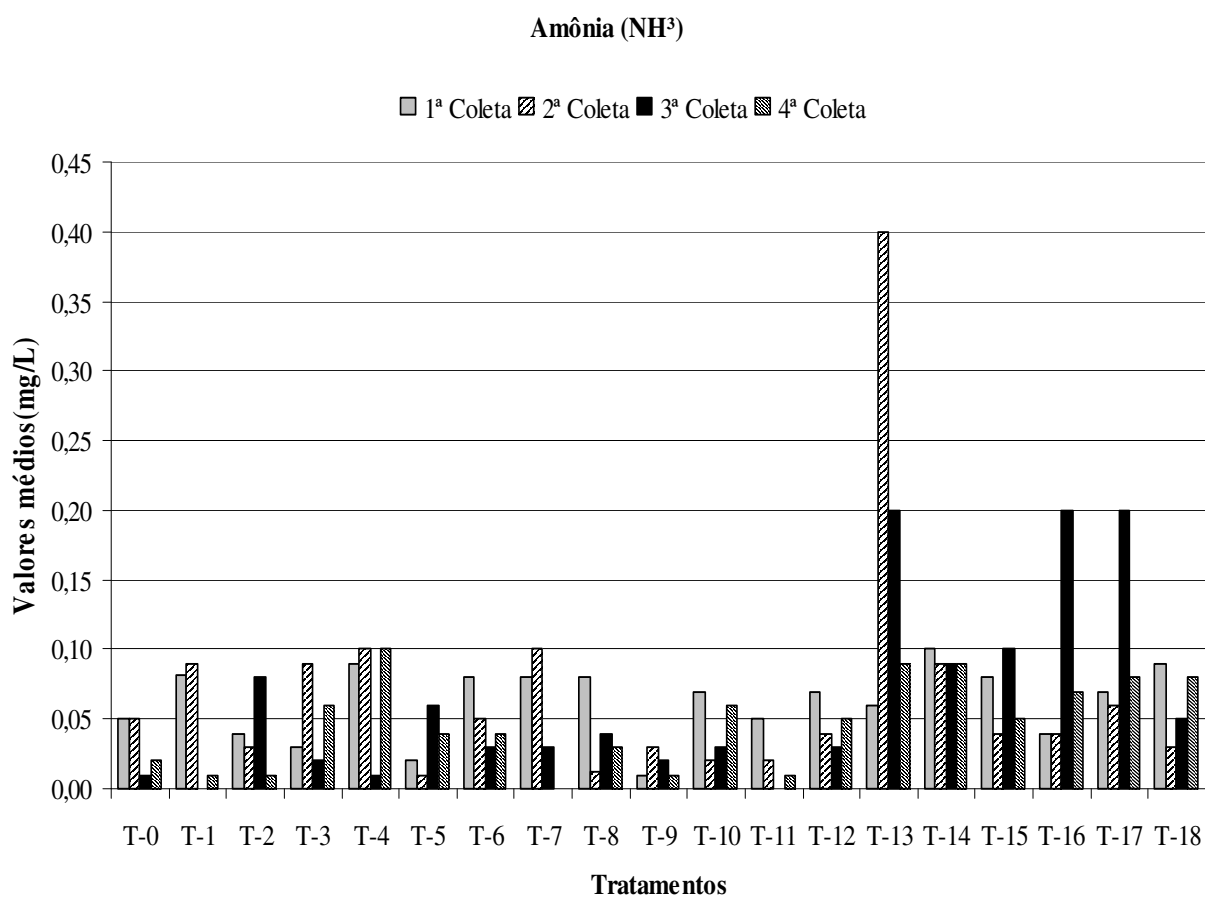


Figura 14 – Valores médios dos níveis de amônia tóxica (NH³).

Tabela 1 – Composição percentual básica da ração utilizada para veicular diferentes dosagens de Praziquantel, levamisol e diflubenzuron em pacus criados em cativeiro.

Ingrediente	%
Farelo de soja	26,22
Milho	31,13
Farelo de trigo	28,58
Farinha de peixe	11,62
Óleo de soja	1,95
Suplemento vitamínico e mineral*	0,50
Composição Calculada	
Proteína Bruta (%)	26,00
Extrato Etéreo (%)	7,00
Fibra Bruta (%)	5,81
Energia Bruta (kcal/kg de ração)	4.150
Extrato Não Nitrogenado (%)	44,00
Matéria Mineral	6,77

* Composição do suplemento vitamínico e mineral (Supremais): vitamina A 1.200.000 UI, vitamina B1 4.800 mg, vitamina B12 4.800 mg, , vitamina B2 4.800 mg, vitamina B6 4.800 mg, vitamina D3 200.000 UI, vitamina K3 2.400 mg, Ácido fólico 1.200 mg, Biotina 48 mg, Pantotenato de cálcio 12.000 mg, Cloreto de colina 108 g, Niacina 24.000 mg, Selênio 100 mg, Iodo 100 mg, Cobalto 10 mg Cobre 3.000 mg, Ferro 50.000 mg, Manganês 20.000 mg, Zinco 30.000 mg, veículo 1.000 g, antioxidante 25 g.