

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

PROTOCOLO DE ACLIMATAÇÃO E QUARENTENA PARA
TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

PETERSON EMMANUEL GUIMARÃES PAIXÃO

Aracaju,
Outubro - 2023

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**PROTOCOLO DE ACLIMATAÇÃO E QUARENTENA PARA
TAMBAQUI *Colossoma macropomum***

Tese de doutorado submetido à banca
examinadora para obtenção do título de
doutor em Saúde e Ambiente, na área de
Ambiente, Desenvolvimento e Saúde.

PETERSON EMMANUEL GUIMARÃES PAIXÃO

Orientador

Dr. Rubens Riscali Madi

Co-orientador

Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto

Aracaju
Outubro - 2023

Paixão, Peterson Emmanuel Guimarães
P149a Aclimação e quarentena do tambaqui *colossoma macropomum* para
prevenção de disseminação de doenças e mortalidades [manuscrito] /
Peterson Emmanuel Guimarães Paixão. – Aracaju, SE, 2023.
92 f. : il. ; color.

Orientador: Rubens Riscali Madi.
Co-orientador: Rodrigo Yudi Fujimoto
Tese (Doutorado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes,
Programa de Pós-Graduação em Saúde e ambiente, 2023.

1. Aquicultura. 2. Aclimação. 3. Profilaxia. I. Madi, Rubes Riscali orient. II.
Fujimoto, Rodrigo Yudi, co-orient. III. Título.

CDU: 639.3.04:369.3.09

PROTOCOLO DE ACLIMATAÇÃO E QUARENTENA PARA TAMBAQUI

Colossoma macropomum

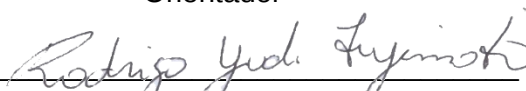
Peterson Emmanuel Guimarães Paixão

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDO À BANCA EXAMINADORA PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
AMBIENTE, DESENVOLVIMENTO E SAÚDE.

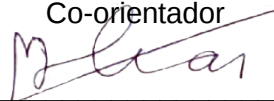
Aprovado por:



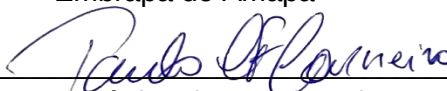
Rubens Riscala Madi D.Sc.
Orientador



Rodrigo Yudi Fujimoto D.Sc.
Co-orientador



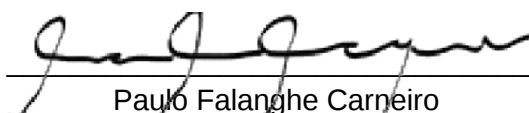
Marcos Tavares Dias D.Sc.
Embrapa do Amapá



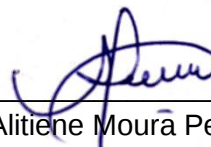
Verônica de Lourdes Sierpe Jeraldo D.Sc.
Universidade Tiradentes



Maria Nogueira Marques D.Sc.
Universidade Tiradentes



Paulo Falanghe Carneiro
Embrapa Tabuleiros Costeiros



Alitene Moura Pereira
Embrapa Tabuleiros Costeiros (Suplente)

Aracaju
Outubro - 2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Manoel Messias da Paixão e Maria Auxiliadora Guimarães Paixão, ao meu Irmão Jefferson Emmanuel Guimarães Paixão e minha Companheira Márcia Valéria Silva do Couto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por cada detalhe, todas as vitórias e derrotas!

Agradeço a minha família: meus pais Manoel Messias da Paixão e Maria Auxiliadora Guimarães Paixão, meu irmão Jefferson Emmanuel Guimarães Paixão e minha companheira Márcia Valéria Silva do Couto; por todo apoio e exemplo que eles me deram no âmbito pessoal e profissional.

Agradeço ao meu orientador Rodrigo Yudi Fujimoto pela paciência, por todo conhecimento e por cada ensinamento.

Agradeço a todos os meus amigos durante toda essa trajetória.

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro fornecido durante todo período de doutorado.

Agradeço ao projeto BRSAqua/Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social/CNPq/ MAPA pelo apoio a pesquisa

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	ix
Introdução	1
Objetivo	3
CAPITULO 1	4
Revisão de literatura	5
Aquicultura	5
Tambaqui	6
Estresse E Patologia	7
Profilaxia	9
CAPITULO 2 –	17
Aspectos Éticos	18
Estresse Por Transporte	18
Preparo Dos Tanques	21
Experimento 1 Protocolo de aclimatação padrão	22
Experimento 2 Protocolo de aclimatação e suscetibilidade infecciosa	23
Experimento 3. Influência do manejo e intensidade de estresse	24
Experimento 4. Gradientes de variação e uso do sal no transporte	25
Experimento 5: Tempo e densidade ideal de quarentena	26
Experimento 6: Medidas mitigadoras da presença de patógenos na quarent... ..	26
Análise Hematológica	27
Estatística Dos Dados	28
Referências	29
CAPITULO 3 -	32
Experimento 1 Protocolo de aclimatação padrão	33
Experimento 2 Protocolo de aclimatação e suscetibilidade infecciosa	37
Experimento 3. Influência do manejo e intensidade de estresse	48
Experimento 4. Gradientes de variação e uso do sal no transporte	52
Experimento 5: Tempo e densidade ideal de quarentena	58
Experimento 6: Medidas mitigadoras da presença de patógenos na quarent. ..	66
Discussão	69
Conclusão	74
CAPITULO 4	75

PROTOCOLO DE ACLIMATAÇÃO E QUARENTENA	76
CAPITULO 5	80
Considerações finais	81
REFERENCIAS	83

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar um protocolo de aclimação e quarentena para o peixe tambaqui *Colossoma macropomum*. Para tanto, juvenis de tambaqui (4~5g) foram submetidos a estresse por transporte e então conduzidos a diferentes experimentos de aclimação e quarentena. Os experimentos de aclimação foram delineados para avaliar: **EXP1** – aclimação padrão dos animais, **EXP2** – susceptibilidade infecciosa dos peixes pós aclimação, **EXP3** – Efeito da intensidade do estresse por transporte na aclimação, **EXP4** – Influencia dos parâmetros de água no procedimento de aclimação. Após a determinação dos procedimentos adequados de aclimação, seguiu-se os experimentos de quarentena que avaliaram: **EXP5** – Influencia da densidade de estocagem e tempo de permanência em uma quarentena; e **EXP6** – Medidas mitigadoras da presença de patógenos na quarentena. Para os experimentos **EXP2**, **EXP5** e **EXP6** os animais foram desafiados com bactéria *Aeromonas hydrophila* e fungo *Saprolegnia parasitica*. Em todos os experimentos, os animais foram submetidos a coleta de sangue para avaliação de parâmetros bioquímicos, eritrocitários, leucocitários e gasométrico em tempos pré-determinados. Nos experimentos de aclimação **EXP1** e **EXP2**, o procedimento de aclimação longa (60 minutos) se mostrou inadequada pois provocou maior elevação da glicemia, lactato, cortisol, redução de células de defesa como linfócitos e trombócitos, infecção bacteriana e fúngica, e maior taxa de mortalidade. Já a aclimação de 30 min promoveu retorno aos valores normais em 52% dos parâmetros analisados em até 96h. No EXP 3, observou-se que a intensidade do estresse influencia no método de aclimação a ser utilizado, mas a aclimação de 30 minutos proporciona melhores condições fisiológicas para os peixes no novo ambiente de confinamento. Pelo **EXP4**, os tambaquis devem ser monitorados principalmente quando aclimatados em tanques com água ácida e fria pois este ambiente causou respostas negativas nos parâmetros bioquímicos, eritrocitários e maior perda de sais no sangue comparados à outras condições ambientais. Durante o **EXP5**, a maior densidade (2g/L) e na presença de patógenos, resultou em ocorrência sinais clínicos por infecção bacteriana e consequente mortalidade dos animais em 34 dias de quarentena. Os diferentes modelos de quarentena com processos de mitigação (**EXP 6**) não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle. Em conclusão, os peixes devem ser submetidos ao procedimento de aclimação curta (30 minutos) em água quente e alcalina, e posteriormente mantidos em quarentena por no mínimo 34 dias com densidade de estocagem 1g/L.

PALAVRAS CHAVES: Aquicultura, boas práticas de manejo, profilaxia.

ABSTRACT

This study aimed to determine a protocol of acclimation and quarantine for round fish tambaqui *Colossoma macropomum*. Therefore, juveniles of tambaqui (4~5g) were submitted to transport stress and then conducted for different experiments of acclimation and quarantine. For acclimation experiments: EXP1 – Standard acclimation for tambaqui juveniles, EXP2 – infectious susceptibility of the fish after acclimation, EXP3 – Effect of the intensity by stress transport in the acclimation, EXP4 – influence of the water quality parameters on acclimation procedure. After determined the adequate procedures for acclimation, quarantine experiments were carried out such as: EXP5 – influence of the time and stocking density in quarantine, EXP6 – mitigate measures for pathogens prophylaxis in quarantine. For experiments EXP2, EXP3 and EXP4, the animals were challenged by *Aeromonas hydrophila* and *Saprolegnia parasitica*. In all experiments, the animals were submitted to the blood collect to determine biochemical parameters, red blood cells, white blood cells, ions and gas. In the first and second experiments (acclimation), the long procedure (60min) were inadequate to tambaqui causing higher glucose, lactate, cortisol, and reduction of defense cells such as lymphocytes and thrombocytes, as well as promote bacterial and fungal infection and higher mortality rate. Whereas the short acclimation (30min) promoted return to the normal values (approximately 52%) for blood parameters at least in 96 hours. In the EXP3, the intensity of stress influenced the acclimation procedure, but the short acclimation ensured better fish physiological conditions to adapt to the new rearing environment. According to EXP4, tambaqui must be monitored mainly when acclimated in cold and acid water, because the negative responses for biochemical parameters, red blood cells and the higher loss of sodium. In quarantine experiment, higher stocking density (2g/L) in EXP5, due to presence of pathogens, caused clinical signs by bacterial infection and consequently mortality in 34 days of quarantine. Different quarantine measures to mitigate stress and pathogen infection (EXP6) did not showed statistical difference compared to the control. In conclusion, fish must be submitted to the short acclimation procedure (30min) in warm and alkaline water, and then remain in quarantine at least 34 days at stocking density 1g/L.

KEY WORDS: Aquaculture, best management practices, prophylaxis.

1. INTRODUÇÃO

A produção de organismos aquáticos destaca-se como uma das principais cadeias produtivas de proteína animal. Nos últimos 20 anos, o volume produzido pela aquicultura triplicou atingindo aproximadamente 112 milhões de toneladas gerando 250 bilhões de dólares (TACON *et al.*, 2020; NALYOR *et al.*, 2021). No Brasil, esta atividade movimenta aproximadamente 1 bilhão de dólares com uma produção de 800 mil toneladas ao ano (VALENTI *et al.*, 2021).

No cenário nacional, destaca-se o tambaqui *Colossoma macropomum* como a espécie nativa mais produzida devido a sua rusticidade, facilidade de cultivo e boa aceitação de mercado (IBGE *et al.*, 2021). No entanto, essa alta produção de cativeiro já registra problemas com enfermidades gerando perdas econômicas aos produtores (BOUWMEESTER *et al.*, 2021). Outro grande problema está relacionado a transmissão dessas doenças dos animais confinados para o meio ambiente ou diretamente para o homem (BEHRINGER *et al.*, 2020).

Alguns patógenos (em especial as bactérias) classificados como “oportunistas” são os principais responsáveis pelas mortalidades nos sistemas de criação em cativeiro (VILLAMIL *et al.*, 2021). Normalmente, essas doenças estão relacionadas a fatores estressantes como o manejo inadequado. O primeiro e principal manejo realizado em uma produção de cativeiro aquícola é a aclimação e quarentena no momento de recebimento dos peixes sejam larvas ou juvenis. Quando não realizada, ou realizado de forma inadequada, pode ser um fator estressante e causa alterações fisiológicas como a imunossupressão (WINBERG *et al.*, 2016) tornando os animais mais susceptíveis a doenças.

Diversos estudos científicos, antes da execução dos seus experimentos, citam o procedimento de aclimação e quarentena dos peixes (KERETZ *et al.*, 2018; CORRÊA *et al.*, 2018; RAJAN *et al.*, 2018; OH & MARAN, 2018; AZMAT *et al.*, 2018; GUY & ALLEN, 2018; CABILLON & LAZADO, 2019; YAU *et al.*, 2019). Manuais de boas práticas de manejo também recomendam e destacam a importância do manejo de aclimação e quarentena, porém ainda não se tem um protocolo padronizado para esse manejo profilático. Perguntas ainda continuam sem resposta como: qual tempo de aclimação ideal? quais os parâmetros de água mais importantes? É mais perigoso para os peixes, o patógeno que chega ou o patógeno já presente na criação? O tempo de transporte e o estresse gerado, muda a forma como deve-se realizar a aclimação?

A profilaxia é a melhor alternativa para evitar custos onerosos com remediação por quimioterápicos. Algumas alternativas ecologicamente corretas como o uso de probióticos (REYES-BECERRIL *et al.*, 2021) ou fitoterápicos (TIAMIYU *et al.*, 2021), apesar de eficientes precisam de tempo para promover seus benefícios. Dessa forma,

mitigar o estresse de transporte com um manejo de aclimação e quarentena apropriado, para reduzir o estresse e promover a adaptação do animal ao novo ambiente, é fundamental para a redução de mortalidades e disseminação de doenças de forma fácil, rápida e menos onerosa. Assim, o objetivo do presente estudo é determinar um protocolo de manejo adequado para aclimação e quarentena de alevinos de tambaqui *Colossoma macropomum*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Desenvolver protocolo de aclimação e quarentena para alevinos de tambaqui *Colossoma macropomum*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do tempo e manejo de aclimação nos parâmetros sanguíneos do peixe.
- Avaliar suscetibilidade à agente infeccioso pós aclimação.
- Determinar os parâmetros essenciais de qualidade de água para aclimação.
- Avaliar a influência do tempo e densidade de estocagem em uma quarentena.
- Avaliar o efeito de medidas mitigadoras de estresse (sal, formol e nanocompósito) na quarentena em respostas imuno-fisiológicas dos peixes.

CAPITULO 1

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aquicultura

A aquicultura é uma das áreas de maior importância entre os setores de produção de alimento. Na última década (2001 a 2019) foi observado um crescimento médio anual de 5,8%. Este crescimento pode ser atribuído ao constante aumento populacional, sua maior busca por alimentos mais saudáveis e redução da exploração de estoques pesqueiros. De acordo com dados oficiais mais recentes, 20% do consumo médio de proteína animal é oriundo do setor aquícola. Tal consumo é resultado de sua produção que atingiu aproximadamente 110 milhões de toneladas em 2016 representando 47% da produção mundial de pescado. Esta produção aquícola movimentou 232 bilhões de dólares americanos neste mesmo ano (FAO, 2020; SOFIA, 2018).

Dentre os diversos organismos aquáticos produzidos pela aquicultura, os peixes apresentam o maior destaque com mais de 47 milhões de toneladas entre 2015 e 2016. Algumas das principais espécies cultivadas no mundo são carpa capim *Ctenopharyngodon idellus*, carpa prateada *Hypophthalmichthys molitrix*, carpa comum *Cyprinus carpio*, tilápia do nilo *Oreochromis niloticus*, Salmão do atlântico *Salmo solar*, truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, pangas *Pangasius* spp. (FAO, 2018).

Em termos de produtividade, a região asiática agrega 89,4% do mercado produtivo sendo a China o líder do rank mundial com 60% da produção aquícola comercializando espécies como tilápia *Oreochromis niloticus*, carpa *Cyprinus carpio* e pangas *Pangasius* spp. (FAO, 2013; FAO, 2018; SOFIA, 2016; SOFIA, 2018). A América do Sul representa pouco mais de 4.4% da aquicultura mundial, porém com representatividade maior em relação a outras regiões como América do Norte 0,8%, África 2,4%, Europa 3,3% e Oceania 0,3% (FAO, 2018).

Dentre os países da América do Sul, o Brasil permanece em segundo lugar na rank de produção aquícola atrás apenas do Chile. Contudo, estima-se para os próximos 10 anos um crescimento de 89% para o Brasil em comparação ao Chile com 26%. Este potencial de crescimento está ligado as características hidrográficas do país e sua variedade de organismos aquáticos produzidos (Crustáceos, moluscos, anfíbios e microalgas) bem como algumas espécies de forte apelo comercial a exemplo dos peixes redondos como tambaqui ou pacu (VALLADÃO *et al.*, 2016; FAO, 2018).

Espécies exóticas como tilápia *Oreochromis nilóticos* e carpa comum *Cyprinus carpio* ocupam as posições mais altas da cadeia produtiva e comercial brasileira seguindo uma tendência mundial. No entanto, algumas espécies de peixes redondos nativos como pacu *Piaractus mesopotamicus*, pirapitinga *Piaractus brachypomus* e

tambaqui *Colossoma macropomum* apresentam destaque no setor aquícola. As regiões norte e nordeste representam quase toda produção nacional aquícola de peixes redondos, comumente cultivados em viveiros escavados ou barragens (KUBITZA *et al.*, 2015; SOFIA, 2016; IBGE, 2016).

A região nordeste do Brasil apresenta pouco mais de 8% da produção de peixes redondos com aproximadamente 35 toneladas comercializadas em 2017, movimentando mais de R\$ 30 milhões de reais. Apenas o tambaqui *Colossoma macropomum* gerou R\$ 3,6 milhões de reais com produção 22 toneladas. Os principais produtores são o estado do Maranhão com 10 toneladas, Piauí com 4 toneladas e o estado de Sergipe com 1,7 toneladas (PEDROZA-FILHO *et al.*, 2016 SIDRA, 2018).

A produção sergipana de Tambaqui é comumente realizada em tanque escavado com sistema semi-intensivo abrangendo as regiões leste e agreste do estado. Destaca-se como umas das principais fontes de renda para ribeirinhos e produtores piscícolas devido à grande aceitação de mercado, facilidade de cultivo da espécie em cativeiro e incentivos governamentais por parte da CODEVASF (IBGE, 2018; Sidra, 2018). Com todas estas características, o tambaqui *Colossoma macropomum* mostra-se como uma das espécies de maior importância para aquicultura sergipana.

3.2. Tambaqui

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) é uma espécie de peixe redonda reofílica, nativa da bacia amazônica, considerada a segunda maior espécie de escamas da América do Sul. Possui hábito alimentar diversificado, classificado como onívoro e frugívoro por se alimentar de pequenos peixes e frutos caídos no rio durante as estações de chuva (CORRÊA *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2010; LOPERA-BARRERO *et al.*, 2012).

Quando adulto, apresenta uma cor verde-oliva na região dorsal com manchas escuras nas partes laterais e ventrais podendo atingir até 30kg e 100cm (Figura 1) (GOULDING e CARVALHO *et al.*, 1982;).



Figura 1. Peixe amazônico tambaqui *Colossoma macropomum* em fase adulta, fonte: Daniel J. Tregigdo, *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Seu comportamento reprodutivo é complexo com maturidade sexual a partir do terceiro ano de vida tendo alta fecundidade e desova total. No entanto em cultivo de cativeiro sua desova é realizada por indução hormonal com fertilização artificial (GOULDING e CARVALHO *et al.*, 1982, WOOD *et al.*, 1998; VARELLA JUNIOR, 2011).

A expansão de seu cultivo em cativeiro ocorreu a partir dos anos 2000 com a padronização de protocolos para sua reprodução induzida, estudos sobre manejo e alimentação industrializada. De acordo com o Ministério da Pesca e Aquicultura, em 2011 o tambaqui tornou-se a espécie nativa de maior importância econômica nacional. Em 2013, segundo dados do IBGE passou a ser produzido em 96% dos estados do Brasil. Atualmente é a espécie nativa mais produzida devido a sua rusticidade de cultivo como adaptação ao confinamento, resistência a baixas taxas de oxigênio, fácil manejo, aceitação de alimento industrializado, rápido crescimento e alto valor de mercado (GOMES *et al.*, 2005; IBAMA, 2007; IBGE, 2016).

Contudo, a intensificação de sua produção, apesar dos ganhos no setor econômico, promoveu o aumento de enfermidades causando altas taxas de mortalidade e elevação dos custos ao piscicultor (Pavanelli *et al.*, 2008). Diversos fatores estressantes são comumente observados em uma produção de cativeiro tais como altas densidades de estocagem, nutrição inadequada para a espécie cultivada, qualidade de água e transporte inadequado favorecem os surtos de patógenos (BARCELLOS *et al.*, 2000; LEIRA *et al.* 2016).

3.3. Estresse e patologia

A concepção de estresse em peixes foi descrita primariamente como “*uma resposta não específica do corpo a qualquer demanda*”. Esta definição inicial, conhecida como a *Síndrome da Adaptação Geral* (SAG) proposta por Selyes (1950) determina que a ausência de estresse seria a morte. Contudo, ao passar dos anos, descartando a teoria que o peixe está sempre em estado de estresse, novas definições foram formuladas baseadas na quebra da homeostase por um agente estressor (BRETT, 1958; BAYNE, 1985; BARTON & IWANA, 1991; BARTON, 1997).

A definição atual mais aceita foi proposta por Schreck (2000) o qual determina que o estresse em peixes seria uma numerosa quantidade de respostas fisiológicas que ocorrem no organismo que tenta resistir a morte ou reestabelecer sua homeostase. A capacidade adaptativa de cada organismo também é um importante fator a se

considerar para retomada da normalidade frente a duração e magnitude de um agente estressor (KOOLHAAS *et al.*, 2011; WINBERG & COLLEGUES, 2016).

O estresse em peixes pode ser classificado como “agudo”, algo de curta duração como ser capturado por uma rede, ou “crônico” como um procedimento de transporte por mais de 24 horas ou a permanência em tanque com alta densidade de estocagem (BARCELLOS *et al.*, 2000; WINBERG *et al.*, 2016; Leira *et al.* 2016). Independentemente da sua duração (Agudo ou Crônico), a magnitude do estresse pode definir se o organismo consegue superar e promover uma adaptação para reestabelecer sua homeostase, ou se inevitavelmente será levado a morte (WINBERG *et al.*, 2016).

O processo de estresse no organismo é definido em três fases distintas de alterações fisiológicas: A fase primária é iniciada pelo sistema endócrino em resposta a um agente estressor com a liberação corticosteroides (Cortisol) e catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) (PUNKHURST *et al.*, 2011; WINBERG *et al.*, 2016). Diversos tipos de corticosteroides são liberados neste momento, contudo o cortisol é descrito como o principal hormônio relacionado ao estresse em peixes (GORISSEN & FLIK, 2016; PETERSON *et al.*, 2019; SADOUL & GEFFROY, 2019; KULCZYKOWSKA, 2019; TEA *et al.*, 2019).

A segunda fase é responsável pelo aumento da respiração e batimentos cardíacos (atribuídos a liberação de corticosteroides e catecolaminas), alterações metabólicas ligadas ao aumento de glicemia e ácido láctico, consumo do glicogênio hepático, desregulação osmótica e mudanças no sistema hematológico relacionados as células eritrocitárias e leucocitárias (PUNKHURST *et al.*, 2011; WINBERG *et al.*, 2016). A terceira e última fase está relacionada a redução do desempenho produtivo e menor resistência a patógenos (YADA & NAKANISHI, 2002; YADA & TORT, 2016) (Figura 2).

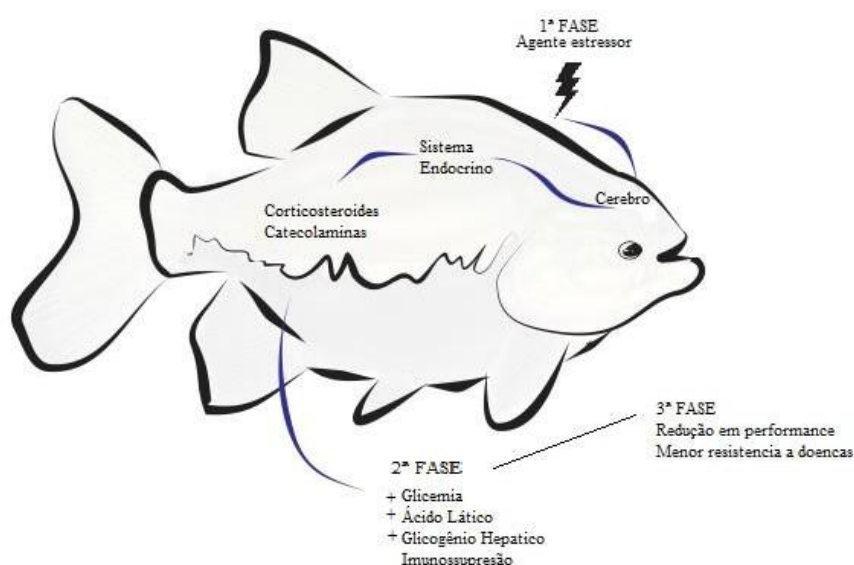


Figura 2. Processo de resposta ao estresse em peixes dividido em três fases de alterações fisiológicas.

A alteração do sistema imunológico ocorrida na segunda fase de resposta ao estresse é o principal fator para a menor resistência a doenças observada na terceira fase (Figura 2). Com isso, patógenos descritos como “*oportunistas*” (fungos, parasitas e bactérias) são os principais causadores de mortalidades (PAVANELLI *et al.*, 2009; TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017; FIORAVANTE & FLORIO, 2017). Bactérias como *Aeromonas hydrophila* ou *Streptococcus agalactiae* são conhecidas por manifestarem sinais de infecção em peixes sob estado de estresse com sistema imunológico debilitado (ALYAHYA *et al.*, 2018; SIRIMANAPONG *et al.*, 2018). O oomiceto *Saprolegnia parasitica*, um “fungus-like” patogênico para peixes, também demonstra oportunismo em situações de estresse (FIROUZBAKHSI *et al.*, 2014; SAHA *et al.*, 2016). Nestas situações, o exame de sangue é comumente reportado na literatura como uma ferramenta eficiente para avaliação de estresse e determinação do quadro clínico dos peixes frente a uma infestação ou infecção (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013; FAZIO, 2018).

De acordo com Aboagye & Allen (2017) foi observado o aumento de glicose, lactato e hematócrito em peixes submetidos a estresse agudo por hipóxia moderada. Alterações hematológicas similares como o aumento de cortisol, glicemia, lactato e triglicerídeo são observadas em peixes submetidos ao estresse de transporte como o Curimatá *Prochilodus lineatus* (DURIGON *et al.*, 2019), o pirarucu *Arapaima gigas* (Brandão *et al.*, 2006) e o tambaqui *Colossoma macropomum* (BRANDÃO *et al.*, 2003).

Essas mudanças causadas por esse tipo de estresse (transporte) podem permanecer por horas, como observado por Santos *et al.* (2020) que demonstram elevados níveis de glicose, lactato e hemoglobina em tambaqui após 36 horas do transporte. Dependendo do nível do estresse, além das alterações hematológicas, pode ocorrer mortalidade em até 96 horas após o manejo de transporte (GOMES *et al.*, 2003). Portanto, com base em um rápido diagnóstico de exame de sangue é possível determinar sinais de estresse e planejar medidas profiláticas para evitar problemas de desempenho zootécnico, susceptibilidade a doenças ou mortalidade.

3.4 Profilaxia

A profilaxia é amplamente usada na aquicultura para evitar custos onerosos com remediação seja por quimioterápicos ou antibióticos (LEAL *et al.*, 2018; MAFTUCH *et al.*, 2018). Alternativas ambientalmente amigáveis como uso de probióticos (Jatobá *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018) ácidos orgânicos (ROMANO *et al.*, 2015; KATYA *et al.*, 2018; Bal, 2018) e óleos essenciais (AL-SAGHEER *et al.*, 2018; SUTILI *et al.*, 2018) são

comumente reportadas na literatura como manejo profilático para evitar problemas com enfermidades.

Contudo, apesar da eficiência profilática proferida por esta melhora imunológica, muitos destes imunoestimulantes precisam de tempo para promover seus benefícios (DIAS *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2018). Surtos de doenças e mortalidades ocorridas no início do cultivo, decorrente de fatores estressantes como o transporte dos peixes ainda permanecem como um problema na aquicultura. Alguns estudos já relatam algumas alternativas para minimizar o estresse durante o transporte como o uso de sal, plantas medicinais e microrganismos administrados como probiótico ou biorremediadores (BARBAS *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2020; CARVALHO *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2003). No entanto, estudos com o propósito de mitigar o estresse após o transporte (no momento da chegada) ainda são inexistentes.

Nesse contexto, os manejos de aclimação e quarentena seriam capazes de minimizar o efeito do estresse de transporte e reduzir possíveis infestações ou infecções por patógenos, além de evitar disseminações (PAVANELLI *et al.*, 2008; TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017; FIORAVANTE & FLORIO, 2017). O procedimento de aclimação é um manejo realizado na aquicultura com objetivo de inserir de forma adequada um organismo aquático em um novo ambiente. Durante este procedimento, é importante observar que os parâmetros de qualidade de água podem ser considerados fatores estressantes (SANTOS AMÂNCIO, 2013). De acordo com Noga (2010), a variação de dois pontos (2) de temperatura e um ponto (1) em pH são suficientes para causar estresse em peixes.

Diversos artigos relataram o procedimento de aclimação no início de seus estudos (KERETZ *et al.*, 2018; CORRÊA *et al.*, 2018; RAJAN *et al.*, 2018; Oh & MARAN, 2018; AZMAT *et al.*, 2018; GUY & ALLEN, 2018; CABILLON & LAZADO, 2019; YAU *et al.*, 2019), porém poucos estudos demonstram efeitos desse manejo no comportamento, alterações fisiológicas e metabólicas, influência na infecção por patógenos e relação com estresse (MAKARAS *et al.*, 2021; FAGGIO *et al.*, 2014; AKINROTIMI *et al.*, 2010; LAHNSTEINER *et al.*, 2019; BAUER, 1991; JONSSON *et al.*, 1999; HARMON, 2009; MADUREIRA *et al.*, 2019). E até o presente momento não existe um protocolo padronizado para este manejo profilático com espécies nativas.

Algumas perguntas continuam sem respostas como: Qual tempo ideal de aclimação, quais parâmetros de água são mais importantes, a falta de protocolos padronizados pode aumentar a suscetibilidade a doenças? O que seria mais perigoso, o patógeno que chega ou o patógeno endêmico da criação? O tempo de transporte e o estresse gerado muda a forma como deve-se realizar a aclimação?

Além da falta de dados científicos para padronização de um processo de aclimação e quarentena, diversos documentos técnicos (tabela 1), específicos para a criação de peixes com boas práticas de manejo, não mencionam ou mencionam de forma empírica o processo de aclimação, provocando diferentes interpretações sobre o procedimento.

Tabela 1. Manejo do procedimento de aclimação oriundas de artigos científicos ou documentos técnicos.

Autor do estudo	Qual Tempo de aclimação?	Qual o Manejo de aclimação?	Qual parâmetro de água é importante?	Qual a influência na fisiologia?	Espécie usada no estudo
Makaras <i>et al.</i> , 2021	2 horas	Não relatado	Não relatado	Não relatado	<i>Oncorhynchus mykiss</i> ; <i>Salmo salar</i> ; <i>Perca fluviatilis</i> ; <i>Gasterosteus aculeatus</i>
Akinrotimi <i>et al.</i> , 2010	7 dias	Não relatado	Não relatado	Alteração sanguínea (redução de células vermelhas e elevação de células brancas)	<i>Tilapia guineensis</i>
Faggio <i>et al.</i> , 2014	15 dias	Não relatado	Não relatado	Alteração sanguínea (redução de células brancas e vermelhas)	<i>Mugil cephalus</i>
Madureira <i>et al.</i> , 2019	28 dias	Não relatado	Não relatado	Alteração sanguínea (Aumento de glicose, cortisol e hemoglobina)	<i>Salmo trout f. fario</i>
Santos Amâncio, 2013	Não relatado	Não relatado	Não relatado	Alteração sanguínea (Aumento de glicose após o transporte)	<i>Colossoma macropomum</i>
https://www.todopez.es/protocolo-aclimatacion	Não relatado	Troca 50% da água de transporte,	Não relatado	Não relatado	Qualquer peixe

		três ou quatro vezes, depois libera apenas os peixes no novo tanque			
https://www.masterfisch.de/img/cms/acclimationation_ES.pdf	45 a 60 minutos	Adiciona água por gotejamento (Não existem trocas), em seguida libera os peixes com a água do transporte dentro do novo tanque.	Não relatado	Não relatado	Qualquer peixe
Centro Internacional de aquicultura do Alabama, Universidade de Auburn, editor Alex Bocek	Não relatado	Não existe troca ou adição de mais água, apenas mantem os sacos de transporte com peixes dentro do novo tanque para equilibrar temperatura, em seguida libera peixes com água dentro do novo tanque	Não relatado	Não relatado	Qualquer peixe
Aclimação, como tornar simples uma complexa e delicada operação (Kubitza, 2009)	1°C a cada 5 a 10 minutos	Adição gradativa de água (volume não especificado)	Temperatura	Não relatado	Qualquer peixe
Boas práticas de transporte (Kubitza, 2009)	Não relatado	Adição gradativa de água (volume não especificado)	Temperatura e pH	Não relatado	Qualquer peixe
https://central3.to.gov.br/arquivo/199427/	Não relatado	Não relatado	Equalizar parâmetros de água (sem	Não relatado	Qualquer peixe

Além do estresse por transporte, uma aclimação inadequada para a espécie pode resultar em alterações hematológicas que podem ser o ponto inicial para uma imunossupressão, favorecendo a manifestação de agentes patogênicos oportunistas e resultando em mortalidade (SCHRECK, 2000; FAZIO, 2018 TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017; FIORAVANTE & FLORIO, 2017). Para camarão marinho, já existem dados científicos mais padronizados para o procedimento de aclimação que pode variar de 24 a 48 horas com trocas parciais de água monitorando principalmente a salinidade (BORGES, 2003; PAULA MENDES *et al.*, 2006; VALENÇA & MENDES, 2009).

Em relação ao procedimento de quarentena, este manejo visa manter os animais confinados sob observação para avaliação do estado de saúde após o transporte e aclimação. De acordo com ICES (2005), um protocolo de quarentena é recomendado depois de qualquer transporte para que posteriormente possa haver a introdução do organismo aquático em um novo local afim de reduzir a disseminação de patógenos. Durante esse processo, algumas medidas para o controle de patógenos são comumente adotadas como a aplicação de medicamentos: praziquantel, formalina, sulfato de cobre, cloroquina, febendazol ou metronidazol (HADFIELD *et al.*, 2011)

Contudo, o uso de alternativas ambientalmente amigáveis (fitoterápicos ou óleos essenciais) também vem sendo agregadas a um manejo de quarentena para potencializar a redução de agentes infecciosos (CARNEIRO *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2013). Com isso, problemas de saúde pública gerados por bactérias ou parasitas de caráter zoonótico podem ser controlados.

No entanto, assim como o procedimento aclimação, este também não tem uma padronização de procedimentos. Diversos estudos científicos descrevem tal manejo após um prévio procedimento de aclimação, mas com informações variadas sem qualquer respaldo técnico ou científico (tabela 2). Algumas perguntas ainda precisam de resposta como qual tempo ideal de uma quarentena? Qual a densidade ideal? O tempo e densidade na quarentena podem ser afetados se os animais estiverem com algum patógeno?

Tabela 2. Dados e forma de manejo do procedimento de quarentena oriundas de artigos científicos ou documentos técnicos

Autor do estudo	Qual Tempo de quarentena?	Qual o Manejo de quarentena?	Qual parâmetro de água é importante?	Qual a influência na fisiologia?	Espécie usada no estudo
Jia <i>et al.</i> , 2017	15 a 90 dias	Não relatado	Não relatado	Não relatado	Qualquer peixe
Hadfield <i>et al.</i> , 2011	30 a 90 dias	Não relatado	Não relatado	Não relatado	Qualquer peixe
Vieira <i>et al.</i> , 2019	7 dias	Não relatado	Não relatado	Não relatado	Tilápia do Nilo
Tachibana <i>et al.</i> , 2021	14 dias	Não relatado	Não relatado	Não relatado	Tilápia do Nilo
Naliato <i>et al.</i> , 2021	40 dias	Não relatado	Não relatado	Não relatado	Tilápia do Nilo

No Brasil, o primeiro marco regulatório para proteção da saúde dos animais aquáticos e que abordou as ações profiláticas dos estabelecimentos de aquicultura foi regulamentado pela Instrução Normativa Nº 53, de 2 de julho de 2003, aprovando o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos. Nesse instrumento normativo, foram regulamentados os critérios sanitários de estabelecimento e os procedimentos a serem praticados na atividade dos animais aquáticos (BRASIL, 2003).

No entanto, esse instrumento apenas regulamentou como medida profilática a notificação, tratamento e destruição dos lotes positivos de doenças listadas como de notificação obrigatória, com foco voltado a importação e exportação de animais aquáticos. Nesse instrumento, o procedimento profilático de quarentena é abordado, mas apenas como forma de espera para os resultados laboratoriais, sem nenhum mecanismo mitigador ou de tratamento das doenças que não sejam de notificação obrigatória e sem maiores detalhes de sua execução (BRASIL, 2003).

Em busca de prevenir, controlar e erradicar doenças nos sistemas de produção de animais aquáticos, no ano de 2015, por meio da Instrução Normativa Nº 04, de 04 de fevereiro de 2015, foi instituído o Programa Aquicultura com Sanidade, estabelecendo-se normas de boas práticas de aquicultura, profilaxia e biossegurança. No que concerne o manejo profilático, há orientação nesse instrumento normativo de adoção de quarentena prévia (tabela 3), para a importação, exportação e trânsito nacional de animais aquáticos (BRASIL, 2015, 2019).

Tabela 3. Procedimentos descritos na Instrução Normativa nº 04 (04 de fevereiro de 2015) sobre a quarentena e ocorrência de doenças de organismos aquáticos.

Quarentena	Permissão de entrada de novos lotes com reinício da contagem.
------------	---

Ocorrência de doenças	Separação de lotes importados, para ser possível isolamento, desinfecção ou tratamento separado.
	Descrever informações: número, procedência, família, quantidade alojados e de mortalidade.
	Com suspeita de doenças ou com altas mortalidades o Serviço Veterinário Oficial deverá ser comunicado.
	O Serviço Veterinário Oficial deverá iniciar investigação 24h após notificação. As despesas de investigação ao monitoramento serão responsabilidade do proprietário, importador ou exportador.

Fonte: Brasil, 2015.

A normativa que regulamentou o Programa Aquicultura com Sanidade foi modificada pela Instrução Normativa Nº 04 MAPA nº 4, de 28 de fevereiro de 2019. No entanto, as modificações no instrumento de 2015, no âmbito sanitário, mencionou apenas a necessidade de autorização para uso de atividade terapêutica e profilática durante o período de quarentena, mas qualquer outra especificação sobre tempo e químicos utilizados não são descritos (BRASIL, 2019).

Para descrever os procedimentos necessários para a quarentena foi publicado pelo governo federal um manual de “Procedimento para Credenciamento e Controle de Quarentenários de Animais Aquáticos”. Nesse manual fica a cargo do estabelecimento interessado a descrever o Manual de Procedimentos Operacionais Padrão, que deverá conter: protocolo de manejo e de eutanásia de animais, procedimentos de desinfecção, tratamentos físicos, químicos ou biológicos com detalhamento sobre produtos e doses ou concentrações utilizadas (com a referência técnica ou científica aplicada), lavagem dos uniformes, destinação de resíduos orgânicos e inorgânicos, tratamento da água de abastecimento e da água de descarte e programa de pragas e roedores. De acordo com o manual de “Procedimento para Credenciamento e Controle de Quarentenários de Animais Aquáticos” o período mínimo de quarentena deve obedecer aos estabelecidos nos Requisitos de Importação Gerais (BRASIL, 2023).

A ausência de procedimentos para realização da quarentena pelos principais documentos regulamentares emitidos pelo governo federal torna essa etapa sanitária despadronizada e pouco eficaz na prevenção, controle e erradicação de doenças nos sistemas de produção aquícola, previstos no Programa Aquicultura com Sanidade (BRASIL, 2015).

Para orientar as atividades dos servidores dos Órgãos Executores de Sanidade Agropecuária para o funcionamento prático do Programa Aquicultura com Sanidade, o

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou um manual de orientação, apenas com instruções de preenchimento de formulários referentes a Instrução normativa Nº 04 de 04 de fevereiro de 2015. Apenas no documento “Manual de Boas Práticas no Transporte de Peixes, também disponibilizado pelo MAPA em 2022, foram apresentadas recomendações sobre técnicas de manejo durante a despesca e transporte, incluindo medidas sanitárias (tabela 4).

Tabela 4: Procedimentos descritos no Manual de Boas Práticas no Transporte de Peixe sobre critérios sanitários dos peixes no momento do transporte animal.

Exigências	
sanitárias para o transporte	Atestado sanitário aliado à um boletim de produção.
Densidade	Taxa de carregamento ou capacidade de carga espécie-específico.
Qualidade da água	Valores de qualidade adequados para a manutenção da qualidade da água satisfatória (oxigênio, dióxido de carbono e níveis de amônia, pH e temperatura).
Medidas mitigadoras de estresse	Utilização de sal, uso de gesso, óleos essenciais, suplementos dietéticos, anestésicos e tranquilizantes.
Indicadores de bem-estar	Bem-estar animal, mortalidade, padrão de natação e reação dos peixes, frequência ventilatória, comportamento alimentar, agressividade, agrupamentos. No entanto, os níveis plasmáticos são descritos pelo documento como não sendo bons indicadores, uma vez que mesmo um transporte adequado ocasiona alterações nesses parâmetros.

Fonte: MAPA (2022).

Desta forma, a profilaxia inicial (aclimação e quarentena) pode reduzir custos onerosos com remediação, bem como assegurar a saúde do animal, a saúde do homem e reduzir impactos ao meio ambiente. Porém, observa-se que tanto a aclimação quanto a quarentena são manejos que embora conhecidos, tanto pelo meio acadêmico quanto o produtivo, são negligenciados, devido à falta de padronização e estudos científicos.

CAPITULO 2

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este estudo aprovado no CEUA (0019/2018) e SISGEN (AA94832; AA040B2) conforme regulamentam as leis 11.794 e 13.123.

4.2 Estresse por transporte

Os juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* foram mantidos em tanques de polietileno com capacidade para 500L (densidade de 0,5g de peixe por Litro) em sistema de recirculação de água com filtro mecânico e biológico (denominados de tanques originais). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (09 e 16 horas) até a saciedade aparente e os parâmetros de qualidade de água foram adequados para a espécie (temperatura 28°C, pH 6, condutividade 400-1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, oxigênio dissolvido 5 mg/L e amônia NH_3 0,0 mg/L) e monitorados com auxílio de uma sonda multiparâmetro *YSI professional plus*. Os animais permaneceram nessas condições por 60 dias até o início de cada experimento.

Para os experimentos descritos a seguir, os peixes (4 a 5g) foram alocados em bolsas plásticas (Figura 3) na proporção de 1/3 de água para 2/3 de oxigênio (injetado a partir de cilindros de oxigênio) com densidade de 1g de peixe/L seguindo as recomendações de Sampaio e Freire (2016) e Gomes *et al.* (2003) e então submetidos ao estresse de transporte (real ou simulado).

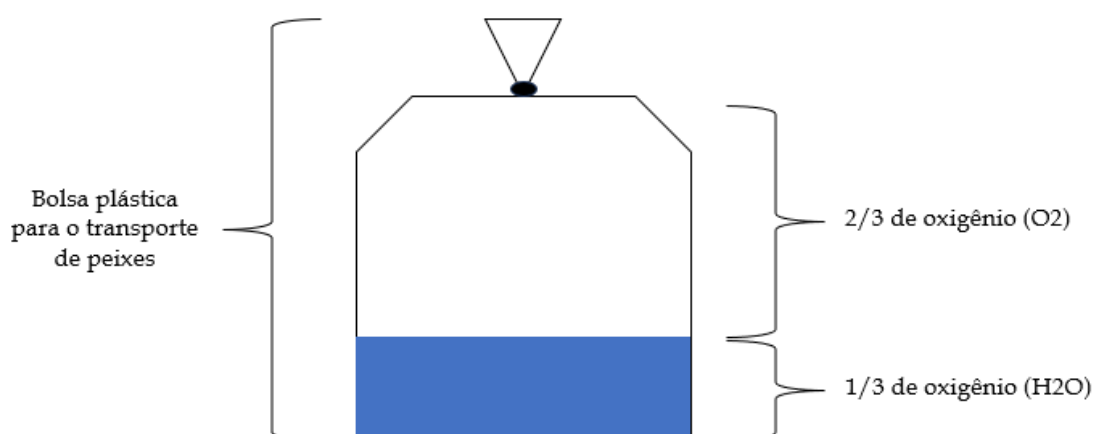


Figura 3. Esquema didático da bolsa plástica usada para o transporte dos peixes contendo as proporções recomendadas de água e oxigênio

Para o primeiro (**EXP1**) e segundo (**EXP2**) experimento de aclimação, foi realizado um transporte real como agente estressor, constituído de uma viagem em automóvel de ida e volta entre a Embrapa Tabuleiros Costeiros (SE) e Jeremoabo (BA) totalizando 08 horas de transporte em um percurso aproximado de 400km (Figura 4).

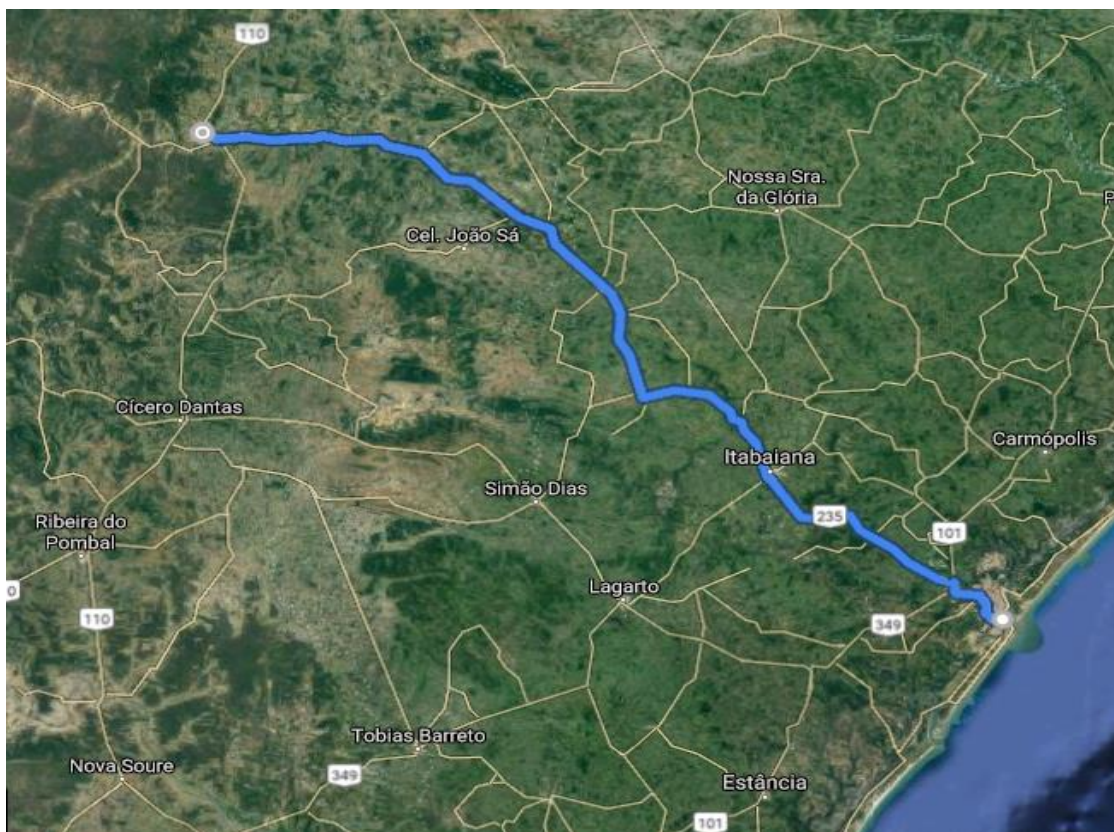


Figura 4. Trajeto do transporte dos peixes realizado da Embrapa Tabuleiros Costeiros (SE) até Jeremoabo (BA) com distância aproximada de 400km e tempo de 08 horas (este trajeto foi realizado para os dois primeiros experimentos). Fonte: GoogleMaps

Para os demais experimentos (**EXP3, 4, 5 e 6**), foi construído um simulador de transporte com objetivo de obter maior controle do estresse causado nos animais em laboratório, evitando assim fatores externos como clima, trânsito e condições da estrada que impediriam assim possíveis inferências entre os experimentos.

O simulador foi construído com uma placa de madeira (1x2m) posicionada acima de um eixo de metal com sistema virabrequim. Este eixo foi plugado a um motor elétrico com potência de dois cavalos de força e com auxílio de um inversor de frequência que foi programado para rotacionar em 60rpm. A rotação do eixo conectado ao motor promove a movimentação da placa de madeira para cima e para baixo de forma constante simulando o movimento da água do saco quando usado um automóvel (Figura

5). Em testes preliminares o estresse simulado resultou em valores glicêmicos semelhantes ao provocado pelo transporte real, validando o simulador de transporte.

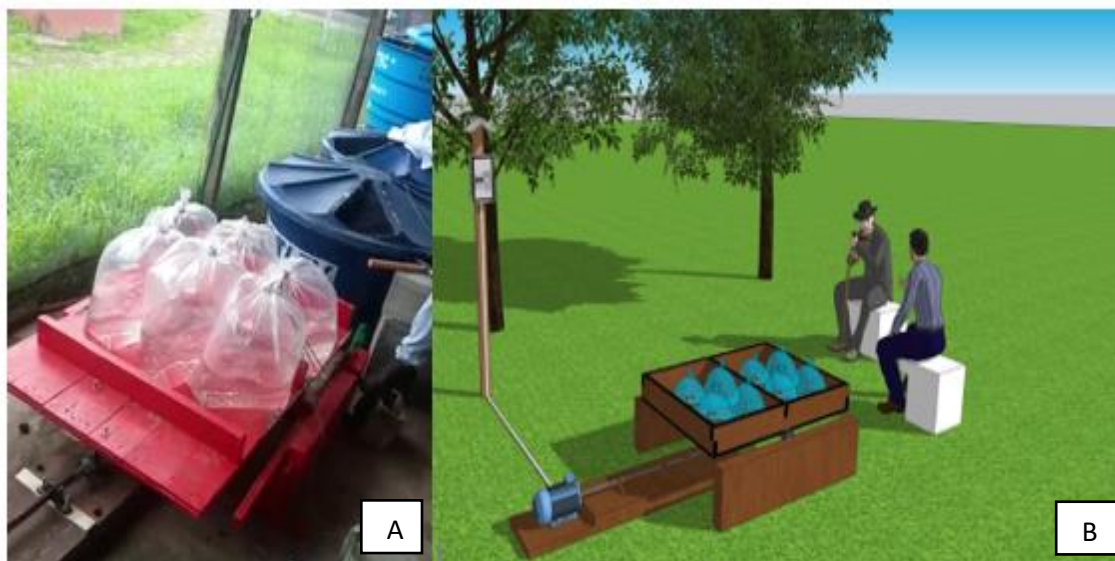


Figura 5. **(A)** Visão real do simulador de transporte contendo os sacos plásticos (1/3 de água e 2/3 de ar) usados para alocação dos peixes durante a simulação de transporte. **(B)** Modelo 3D do simulador de transporte feito no *Google Sketchup*.

Após o estresse (transporte real ou simulado), os animais foram aclimatados (de acordo com cada experimento) em **tanques receptores** (500L em sistema estático) com parâmetros de qualidade de água diferentes dos tanques originais (Tabela 1). A qualidade de água dos tanques receptores foi modificada com auxílio de termostato, ácido acético e/ou hidróxido de sódio de forma que os **tanques originais** apresentassem parâmetros de qualidade de água diferente dos **tanques receptores** (de acordo com cada experimento) para retratar o que ocorre em condições normais de transporte entre diferentes pisciculturas.

Tabela 5. Parâmetros de qualidade de água referente aos tanques usados nos experimentos de aclimação.

	Tanque original	Recipiente de transporte	Recipiente contendo sal	Tanque receptor*	VARIAÇÃO
EXP1					
Temp.	28,47±0,29	29,27±0,16		25,80±0,24	-3
Od.	7,87±0,49	1,98±0,11		4,45±0,29	-2
Cond.	1025,00±44,0	1103,0±38,47		1370,00±14	-300
pH	6,16±0,13	6,24±0,01		7,80±0,08	+1
NH4	1,31±0,05	1,39±0,03		0,04±0,00	-1
NH3	0,00±0,00	0,00±0,00		0,00±0,00	0
EXP2					
Temp.	28,53±0,19	28,40±0,37		25,80±0,19	-3
Od.	5,83±0,30	1,18±0,07		4,55±0,34	-1
Cond.	429,43±3,35	437,13±0,05		132,7±8,84	-300
pH	6,48±0,07	6,44±0,03		7,60±0,04	+1
NH4	1,43±0,14	1,55±0,05		0,02±0,00	-1,4
NH3	0,00±0,00	0,00±0,00		0,00±0,00	0
EXP3 (04 h)					
Temp.	28,15±0,22	28,73±0,07		25,70±0,27	-3
Od.	6,18±0,47	2,77±0,07		4,02±0,06	-2
Cond.	735,75±1,00	751,23±3,47		352,20±97,42	-400
pH	6,52±0,10	6,38±0,06		7,54±0,09	+1
NH4	1,10±0,06	0,99±0,08		0,19±0,09	-0,90
NH3	0,01±0,00	0,02±0,00		0,01±0,00	0,01
EXP3 (08 h)					
Temp.	28,15±0,22	28,80±0,33		25,70±0,27	-3
Od.	6,18±0,47	2,84±0,14		4,02±0,06	-2
Cond.	735,75±1,00	754,70±1,22		352,20±97,42	-400
pH	6,52±0,10	6,45±0,09		7,54±0,09	+1
NH4	1,10±0,06	0,97±0,13		0,19±0,09	-0,90
NH3	0,01±0,00	0,02±0,00		0,01±0,00	0,01
EXP4					
				Redução	Elevação
Temp.	26,82±0,27	28,23±0,29		25,07±0,45	27,92±0,32
Od.	4,80±0,93	0,93±0,12		3,59±0,87	
Cond.	404,08±57,33	458,37±7,85	17144±88,79	1810,30±113,74	218,66±19,178
pH	6,52±0,07	6,56±0,05		4,60±0,12	8,41±0,12
NH4	0,71±0,07	0,73±0,03		0,17±0,14	
NH3	0,09±0,06	0,10±0,01		0,00±0,00	

*indica diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste- t entre os parâmetros de água dos tanques antes e depois da aclimação; temperatura (°C), oxigênio (mg/L), condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$), NH_4^+ e NH_3 (mg/L).

4.3 Preparo dos tanques receptores contaminados com patógenos

Os tanques receptores que precisavam estar livres de patógenos foram previamente higienizados com lavagem (água e sabão) e posteriormente sua água foi desinfetada com uso de cloro (Concentração 4~6% 500 $\mu\text{L}/\text{L}$), e este eliminado dos

tanques após 48h com agitação da água por aeração. Os tanques receptores que precisavam estar contaminados foram preparados antes do início dos experimentos. Os patógenos usados nesses tanques vieram do banco de cepas do laboratório de aquicultura na Embrapa Tabuleiros Costeiros.

A bactéria *Aeromonas hydrophila* foi previamente crescida em tubos de ensaio contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI). Esses tubos de ensaio permaneceram em estufa microbiológica durante 24 horas a 30°C. Após o crescimento bacteriano, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado em solução salina estéril (NaCl 0,65%).

O fungo *Saprolegnia parasitica* foi crescido em placa *petri* contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA) e sementes de gergelim. Após o crescimento em estufa microbiológica (96 horas a 25°C), as sementes foram alocadas em béqueres de vidro contendo meio de indução (PEREIRA-TORRES *et al.*, 2016) e permanecendo sob aeração constante durante 24 horas para formação dos zoósporos.

Após o prévio preparo em laboratório, os patógenos foram inseridos diretamente na água dos tanques com as seguintes concentrações: 10⁹UFC/mL *Aeromonas hydrophila* segundo PEATMAN *et al.* (2018) e 1x10³ de Zoósporo/100L do fungo *Saprolegnia parasitica* segundo FIROUZBAKHSH *et al.* (2014).

4.4. Experimentos de aclimação

4.4.1 Experimento 1. Protocolo de aclimação padrão

Nesse experimento foram avaliados tempos de aclimação após o estresse de transporte. Este experimento ocorreu em delineamento inteiramente casualizado com arranjo de parcelas subdivididas ao tempo (3 fatores principais X 5 subparcelas). Os fatores principais foram três diferentes manejos de aclimação: (**NOAC**) não aclimatar os animais, liberando diretamente na água dos tanques receptores; (**AC30**) aclimação por 30 minutos com trocas parciais de água equalizando parâmetros de temperatura, pH, amônia e condutividade; e (**AC60**) aclimação por 60 minutos com trocas parciais de água equalizando parâmetros; e as subparcelas corresponderam aos tempos de coletas sanguíneas (01, 24, 48, 72 e 96 horas). Durante todo tempo experimental de 96 horas, os animais foram monitorados determinando eventuais mortalidades.

O processo de aclimação consistiu em alocar o saco de transporte nos tanques receptores para início da equalização da temperatura, posteriormente o saco foi aberto e visualizado as condições dos peixes. Nesse momento os parâmetros de qualidade de água de temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido e amônia foram analisados com auxílio de uma sonda multiparâmetro *YSI professional plus*.

A equalização dos parâmetros de água foi realizada utilizando um pote plástico, sendo então retirado 1 litro de água do saco do transporte e colocado 1L de água do tanque receptor no saco de transporte, até a equalização dos parâmetros dentro dos tempos estipulados para cada tratamento (30 min ou 60 min). Essas trocas de água (retirada 1L e adição de 1L) foram realizadas por minuto para aclimação de 30 minutos, e a cada 2 minutos para aclimação de 60 minutos, totalizando o mesmo volume de água trocada para cada procedimento. Após a equalização dos parâmetros dentro dos tempos estipulados, os peixes foram capturados com auxílio de puçá de malha fechada, para não causar danos a pele dos peixes, e então soltos nos tanques receptores.

Para coleta sanguínea 15 peixes antes do estresse de transporte bem como 9 peixes por tratamento nos horários pré-definidos de 01, 24, 48, 72 e 96 horas foram submetidos a coleta de sangue, por punção dos vasos caudais pós anestesia com eugenol (60mg/L) (INOUE *et al.*, 2011) para avaliação dos parâmetros sanguíneos.

4.4.2 Experimento 2. Protocolos de aclimação e suscetibilidade infecciosa

Nesse experimento, em complemento ao experimento anterior, foi avaliado a influência da presença de patógenos nos tanques receptores em relação ao processo de aclimação. Este experimento ocorreu em delineamento inteiramente casualizado com arranjo de parcelas sub-subdivididas ao tempo (3 fatores principais X 2 subparcelas X 5 sub-subparcelas). Os fatores principais foram três diferentes manejos de aclimação (NOAC, AC30 e AC60); a parcela subdividida foi representada pela presença ou não dos patógenos: Grupo 1. tanques previamente contaminados com patógenos, Grupo 2. tanques previamente esterilizados com adição de cloro 4~6% (60mg/mL); e a sub-subparcela correspondeu aos tempos de coletas sanguíneas (01, 24, 48, 72 e 96 horas) (Figura 6).

Após os diferentes procedimentos de aclimação (NOAC, AC30 e AC60), os animais foram alocados em caixas de 500L (270 peixes distribuídos em 18 caixas) em sistema estático (sem recirculação de água) com aeração forçada, distribuídos aleatoriamente entre os tanques (figura 2). Este experimento teve duração de 96 horas, onde foram observados os sinais clínicos, e avaliada a mortalidade e as alterações hematológicas. Como o experimento anterior, 15 peixes antes do estresse de transporte bem como 9 peixes por tratamento nos horários pré-definidos de 01, 24, 48, 72 e 96 horas foram submetidos a coleta de sangue para avaliação dos parâmetros sanguíneos.

Estes mesmos peixes também foram submetidos ao procedimento de coleta de amostra com *swab estéril* (quando demonstraram sinal clínico de doença e mortalidade) para análise microbiológica. Os cotonetes de swab foram esgotados em placas *petri*

contendo meio de cultura *Brain Heart Infusion Agar* (BHI Agar). Após incubação e crescimento bacteriano em estufa (35°C por 24 horas), as colônias crescidas foram identificadas pelo método de MALDI-TOF para confirmação do postulado de Koch.

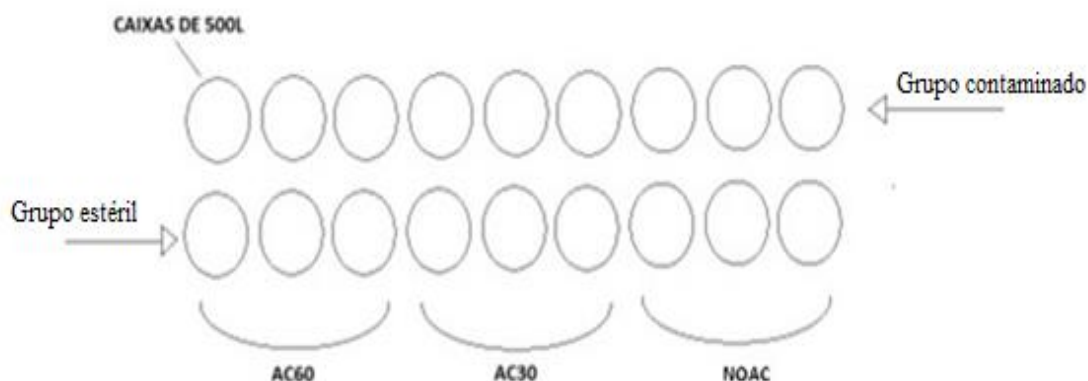


Figura 6. Layout do delineamento inteiramente casualizado com parcelas sub-subdivididos ao tempo do experimento *Protocolos de aclimação e suscetibilidade infecciosa*. Neste layout, cada círculo representa uma caixa de 500L (visão de topo), aleatoriamente distribuídas de três em três para definir os tratamentos. **NOAC**: animais não aclimatados, **AC30**: animais aclimatados em 30 minutos, **AC60**: animais aclimatados em 60 minutos, **Grupo contaminado**: peixes aclimatados em caixas contaminadas com os patógenos, **Grupo estéril**: peixes aclimatados em caixas previamente esterilizadas.

4.4.3 Experimento 3. Influência do manejo e intensidade de estresse

No terceiro experimento foi avaliado a influência da intensidade de estresse sobre o processo de aclimação, sendo que os agentes são o tempo de transporte e a uma simulação de aclimação. Esse experimento ocorreu em delineamento inteiramente casualizado com parcelas sub-subdivididas ao tempo com triplicatas constituído de **Fator 1**: peixes submetidos ao estresse de transporte por quatro horas (04h); **Fator 2**: peixes submetidos ao estresse de transporte por 8 horas (08h). Dentro de cada fator os peixes foram submetidos às três formas de aclimação: **NOAC**, **AC30** e **SIMU**, sendo esse último, uma simulação do procedimento de aclimação, onde não houve trocas de água e realizou-se apenas o manejo de retirada e devolução da água nos sacos de transporte (Figura 2); e as sub-subparcelas corresponderam as análises sanguíneas nos períodos de 01, 24, 48, 72 e 96 horas.

A substituição do tratamento AC60 pelo tratamento SIMU foi esquematizada para responder se o manejo de aclimação poderia causar algum estresse adicional. Essa alteração foi baseada nos resultados dos experimentos anteriores. Os peixes, após o

procedimento de manejo de aclimação (NOAC, AC30 e SIMU), foram alocados em caixas de 500L (270 peixes distribuídos em 18 caixas) em sistema estático (sem recirculação de água) com aeração forçada. Os animais foram então monitorados durante 96 horas e o sangue coletado de nove animais por tratamento nos horários pré estabelecidos para avaliação hematológica.

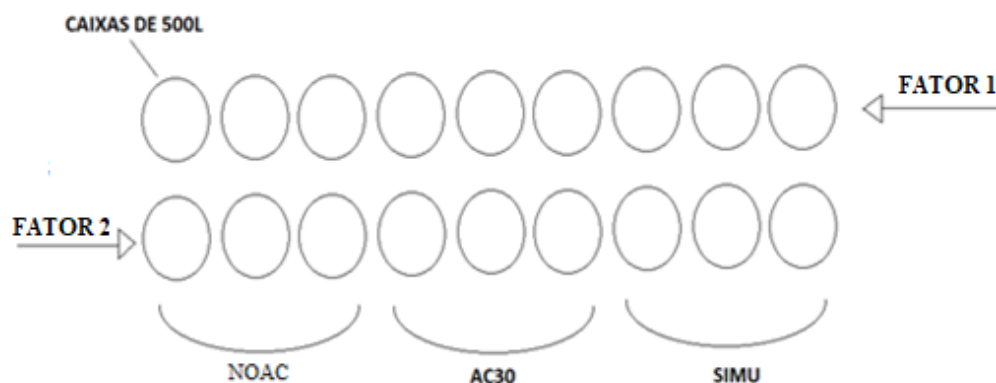


Figura 4. Layout do delineamento inteiramente casualizado com parcelas sub-subdivididas ao tempo referente ao experimento “*Intensidade de estresse e manejo de aclimação*”. (**Fator 1**): peixes submetidos a quatro horas de simulação de transporte; (**Fator 2**): peixes submetidos a oito horas de simulação de transporte.

4.4.4 Experimento 4. Gradientes de variação e uso do sal no transporte

Nesse experimento avaliou-se a presença de sal no transporte e o quanto as diferenças entre a qualidade de água do tanque original e dos tanques receptores influencia no processo de aclimação. Este experimento foi em delineamento em parcelas sub-subdivididas com três fatores principais, duas subparcelas e 5 tempos de coleta de sangue, em triplicata. Os fatores foram baseados na equalização dos parâmetros temperatura (°C) e valores de pH (tabela 3) simulando ambientes quente, frio, ácido e básico. As subparcelas foram constituídas da seguinte forma: **COM SAL**- Peixes submetidos ao estresse de transporte por oito horas com uso de sal (8g/L GOMES *et al.*, 2003); **SEM SAL**- Peixes submetidos ao estresse de transporte por oito horas sem uso de sal. Ao final do estresse, os peixes foram aclimatados com o procedimento de manejo rápido (AC30) e alocados nos tanques receptores conforme os tratamentos estipulados. Este experimento utilizou 270 peixes aclimatados em caixas de 500 litros com sistema estático e aeração forçada. O ensaio durou 96 horas determinando alterações hematológicas em horários pré-definidos (01, 24, 48, 72 e 96 horas), sendo realizado da mesma forma que no experimento anterior.

Tabela 6. Delineamento inteiramente casualizado com variações de temperatura e pH do experimento *Gradientes de variação e uso do sal*.

Transporte	Fator principal (tratamentos)	Temperatura (°C)	pH
Com Sal	T1 (Frio e ácido)	25,07±0,45	4,60±0,12
	T2 (Quente e alcalino)	27,92±0,32	8,41±0,12
	T3 (Quente e ácido)	27,92±0,32	4,60±0,12
Sem Sal	T4 (Frio e ácido)	25,07±0,45	4,60±0,12
	T5 (Quente e alcalino)	27,92±0,32	8,41±0,12
	T6 (Quente e ácido)	27,92±0,32	4,60±0,12

COM SAL: Peixes submetidos a estresse por transporte com adição de sal na água, SEM SAL: Peixes submetidos a estresse por transporte sem adição de sal na água, Temp.: temperatura com variação em °C.

4.5. Experimentos de quarentena

4.5.1 Experimento 5: Tempo e densidade ideal de quarentena

O primeiro experimento da etapa de quarentena avaliou a densidade de estocagem e a presença de patógenos nos tanques receptores, considerando o tempo de monitoramento mínimo adequado para realização do processo de quarentena. Foi realizado um experimento em delineamento inteiramente casualizado em parcelas sub-subdivididas ao tempo, avaliando: presença ou ausência de patógenos na quarentena (tanques contaminados e tanques estéreis) e diferentes densidades de estocagem (1g/L e 2g/L de densidade) por 45 dias. Um total de 480 peixes foram usados neste experimento. Os animais foram aclimatados de forma rápida (30 minutos de aclimação), de acordo com os resultados descritos nos experimentos anteriores. Após o procedimento de aclimação, os peixes foram divididos em caixas de água de 500L de acordo com o delineamento proposto, e alimentados com ração comercial 32%PB, duas vezes ao dia na taxa de alimentação de 10% PV. Em momentos pré-determinados (1, 15 e 45 dias após estresse por transporte), 12 peixes por tratamento foram submetidos a coleta de sangue para realização das análises hematológicas.

4.5.2 Experimento 6: Medidas mitigadoras da presença de patógeno na quarentena

No experimento 6, utilizou-se 240 peixes para avaliar diferentes produtos para mitigar o efeito da presença dos agentes patogênicos no processo de quarentena. Este experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado avaliando quatro diferentes manejos na quarentena para observar possível efeito mitigador de estresse causado pela presença dos patógenos na água. Os peixes após simulação de transporte de 8 horas, foram submetidos a aclimação de 30 minutos conforme experimentos

prévios e mantidos na quarentena na densidade de 1g/L e alimentados após o 4º.dia de quarentena, com ração comercial 32% de proteína bruta duas vezes ao dia na taxa de alimentação de 10% do peso vivo.

Os modelos de quarentena testados foram (CONTROLE: quarentena sem qualquer mitigação; T1: quarentena contendo sal a 0,1% de acordo com Kumar *et al.*, 2018; T2: quarentena contendo formalina 15mg/L Francis-Floyd, 1996; e T3: quarentena contendo nanocompósito de prata e cobre adaptado de Meneses *et al.*, 2019). Além disso, foi incluído no experimento um tratamento controle negativo constituído por peixes que não foram submetidos a procedimentos de aclimação (liberados imediatamente após transporte) e foram alocados em quarentena contendo patógeno sem qualquer medida mitigadora. Em diferentes momentos (1, 15 e 45 dias após estresse por transporte), 12 peixes por tratamento foram submetidos a coleta de sangue para realização das análises hematológicas.

A inoculação dos patógenos *Aeromonas hydrophila* e *Saprolegnia parasitica* nos tanques da quarentena seguiu os mesmos procedimentos e concentrações mencionadas no item “Preparo dos tanques receptores contaminados com patógenos”. Os patógenos eram reinoculados a cada semana para garantir a presença dos patógenos na água.

4.6 Análise hematológica

As coletas de sangue foram realizadas em diferentes momentos de acordo com a proposta de cada experimento (**aclimação:** 01, 24, 48, 72 e 96h; **quarentena:** 1, 15 e 45 dias). Para tanto, os animais foram submetidos a anestesia com eugenol (60mg/L) (INOUE *et al.*, 2011) e então foi realizada coleta de sangue em vasos caldais utilizando seringas umedecidas em EDTA 3%.

As amostras sanguíneas foram conduzidas à análises de cortisol (g/dL) usando reagentes do kit “*Human Cortisol Elisa Kit*”, glicose (mg/dL) e lactato (g/dL) com analisador automático Accucheck Active®, níveis de sódio (Na), potássio (K), cálcio ionizado (iCa), pressão parcial de oxigênio (pO2 mmHg), pressão parcial de gás carbônico (pCO2 mmHg) e pH sanguíneo com i-STAT® *system test cartridge*. O número de eritrócitos totais (µL) foi aferido em câmara de Neubauer, porcentagem de hematócrito pelo método de micro hematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971), hemoglobina (g/dL) em analisador bioquímico.

Os índices hematimétricos (**VCM** - volume corpuscular médio, **HCM** - hemoglobina corpuscular média, **CHCM** - concentração de hemoglobina corpuscular média) calculados de acordo com Vallada (1999). Também foram confeccionadas

extensões sanguíneas (coradas com kit panótico) em lâmina de vidro para contagem de trombócitos totais e diferencial de leucócitos (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

4.7 Estatística dos dados

Todos os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homoscedasticidade de Shapiro-wilk e Bartlett. Em seguida foram conduzidos a análise de variância seguido pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$) para comparação de média. Os dados de qualidade de água entre os tanques antes e depois da viagem, bem como os dados hematológicos (basal e cada hora individual de análise) foram conduzidos a teste-t para comparação de médias, com auxílio do software Past e BioEstat. Os dados do segundo experimento de aclimação (todos os dados hematológicos) foram também conduzidos a análise de componentes principais ($PC1+PC2 > 80\%$) para determinação de possíveis agrupamentos.

5. REFERÊNCIA

- AKINROTIMI, O.A.; UEDEME-NAA, B.; AGOKEI, E.O. Effects Of Acclimation On Haematological Parameters Of *Tilapia guineensis* (Bleeker, 1862). *Sci world j.* 2010; 5: 1-4.
- AL-SAGHEER, A. A.; MAHMOUD, H. K.; REDA, F. M.; MAHGOUB, S. A.; AYYAT, M. S. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquac. nutr.* 2018, 24(3):1006-1014.
- ALYAHYA, S. A.; AMEEN, F.; AL-NIAEEM, K. S.; AL-SA'ADI, B. A.; HADI, S.; MOSTAFA, A. A. Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*. *S. j. bio. sci.* 2018, 25(1): 182-185.
- BARBAS, L. A. L.; DE ARAÚJO, E. R. L.; TORRES, M. F.; MALTEZ, L. C.; DE OLIVEIRA GARCIA, L.; HEINZMANN, B. M.; SAMPAIO, L. A. Stress relieving potential of two plant-based sedatives in the transport of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 2020, 520: 734681.
- BORGES, D. A. Aclimação de pós-larvas do Camarão Marinho *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) para águas Oligohalinas, 2003.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil, 2018.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**, 44. Brasil, 2016.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da Pesca 2007**. Brasil, 2007.
- CORRÊA, C. F.; NOBREGA, R. O.; BLOCK, J. M.; FRACALLOSSI, D. M. Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. *Aquaculture* 2018, 497: 82-90.
- DIAS, J. A.; ABE, H. A.; SOUSA, N. C.; COUTO, M. V.; CORDEIRO, C. A.; MENESES, J. O.; FUJIMOTO, R. Y. Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquac. Res.* 2018, 49(9): 3063-3070.
- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. In: Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. p. 171-171, 2000.
- FAGGIO, C.; FEDELE, G.; ARFUSO, F.; PANZERA, M.; FAZIO, F. Haematological and biochemical response of *Mugil cephalus* after acclimation to captivity. *Cah Biol Mar* 2014, 55(1): 31-36.
- FAO. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fishery and aquaculture statistics, Rome, Italy. Geneva: 2015.
- FAO. Meeting the sustainable development goals.
- FERREIRA, A. H. C.; LOPES, J. B.; ARARIPE, M. D. N. B. A.; MONTEIRO, C. A. B.; ANDRADE, F. T. Probiotic addition effect assessment in the diet of fingerling and juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) created in treated sewage. *Engenharia Sanitaria e Ambiental* 2018, 2: 665-674.
- FIORAVANTI, M. L.; FLORIO, D. Common diseases in marine ornamental fishes. *Marine ornamental species aquaculture*, 2017, 347-380.

FIROUZBAKHS, F.; MEHRABI, Z.; HEYDARI, M.; KHALES, M. K.; TAJICK, M. A. Protective effects of a synbiotic against experimental *Saprolegnia parasitica* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture research* 2014, 45(4): 609-618.

FIROUZBAKHS, F.; MEHRABI, Z.; HEYDARI, M.; KHALES, M. K.; TAJICK, M. A. Protective effects of a synbiotic against experimental *Saprolegnia parasitica* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Res.*, 2014, 45(4), 609-618.

GARCIA, D. B.; BOIJINK, C. D. L.; BATISTA, E.; INOUE, L.; CHAVES, F. Avaliação da atividade anti-Helmíntica do óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) para matrinxã (*Brycon amazonicus*). In: Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em anais de congresso (ALICE). Embrapa, 2013. p. 169-179.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology* 1975, 56(1): 35-39.

GOLDENFARB, Paul B. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Americ. J. Clin. Pathol.*, 1971, 56(1), 35-39,

GOMES, L. C.; URBINATI, E. C.; BALDISSEROTTO, B. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, 2005, p. 225-246.

KATYA, K.; PARK, G.; BHARADWAJ, A. S.; BROWDY, C. L.; VAZQUEZ-ANON, M.; BAI, S. C. Organic acids blend as dietary antibiotic replacer in marine fish olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquac. res.* 2018, 49(8): 2861-2868.

KUBITZA, F. (2015). Aquicultura no Brasil. *Panorama da Aquicultura*, 2: 10-23.

Kubtiza 2009.

LEAL, J. F.; NEVES, M. G. P.; SANTOS, E. B.; ESTEVES, V. I. Use of formalin in intensive aquaculture: properties, application and effects on fish and water quality. *Reviews in Aquaculture* 2018, 10(2): 281-295.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L. D. M.; POVEDA-PARRA, A. R.; DIGMAYER, M. As principais espécies produzidas no Brasil. Lopera-Barrero, NM; Ribeiro, RP; Povh, JA; Vargas, LDM, p. 143-215. 2011.

MAFTUCH, M.; SUPRASTYANI, H.; SANOESI, E.; PUTRA, G. A.; PUTRA, M. F.; PRIHANTO, A. A. The Effects of Ketapang (*Terminalia catappa*) Bark Crude Extract on Inhibition of *Aeromonas hydrophila* Growth and Blood Cells of the Infected Carp (*Cyprinus carpio*). *Rekayasa* 2018, 11(2): 87-94.

MAKARAS, T.; STANKEVIČIŪTĖ, M.; ŠIDAGYTĖ-COPILAS, E.; VIRBICKAS, T.; RAZUMIENĖ, J. Acclimation effect on fish behavioural characteristics: determination of appropriate acclimation period for different species. *Journal of Fish Biology* 2021, 99(2): 502-512.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: Eduem, 2008.

PEDROZA FILHO, M. X.; RODRIGUES, A. P. O.; REZENDE, F. P. Dinâmica da produção de tambaqui e demais peixes redondos no Brasil. *Bol. Ativ. Aquic.* 2016, 2: 1-5.

QUESADA, S.P.; PASCHOAL, J.A.; REYES, F.G. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones—a review. *J. food Sci.* 2013, 78(9): R1321-R1333.

- RANJAN, A.; SRIVASTAVA, P. P.; JAIN, K. K.; MURALIDHAR, P. A. Comparative evaluation of metabolic enzymes activities in different tissues of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) fingerlings reared at ambient and higher temperature. *Ira. J. Fish. Sci.* 2018, 19(2): 893-903.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. Características hematológicas da tainha, *Mugil Platanus* (Osteichthyes, Mugilidae) da Região Estuarino-Lagunar de Cananéia-SP. *Bol Inst. Pesc.* 1995, 22(1):1-22.
- ROMANO, N.; KOH, C. B.; NG, W. K. Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 2015, 435: 228-236.
- SAHA, H.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; SAHA, R. K. Feeding pyridoxine prevents *Saprolegnia parasitica* infection in fish *Labeo rohita*. *Fish & shellfish Immunol.* 2016, 59: 382-388.
- SALAH, A. S.; EL NAHAS, A. F.; MAHMOUD, S. Modulatory effect of different doses of β -1, 3/1, 6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*. *Fish & shellfish immunol.* 2017, 70: 204-213.
- SANTOS, E. L. R.; REZENDE, F. P.; MORON, S. E. Stress-related physiological and histological responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to transportation in water with tea tree and clove essential oil anesthetics. *Aquaculture* 2020, 523: 735164.
- SIDRA. Pesquisa da pecuária municipal. 2018.
- SIRIMANAPONG, W.; THOMPSON, K. D.; SHINN, A. P.; ADAMS, A.; WITHYACHUMNARNKUL, B. *Streptococcus agalactiae* infection kills red tilapia with chronic *Francisella noatunensis* infection more rapidly than the fish without the infection. *Fish & shellfish Immunol.* 2018, 81: 221-232.
- SOFIA. The state of the world fisheries and aquaculture. FAO, 2018.
- SUTILI, F. J.; GATLIN III, D. M.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture* 2018, 10(3): 716-726.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *J. parasite. diseases* 2017, 41(4), 913-918.

CAPITULO 3

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1. protocolo de aclimação padrão

Após o estresse de transporte, os valores de glicose na primeira hora de análise foram elevados (tabela 7), sendo que os animais do AC60 apresentaram os maiores valores glicêmicos (107,83 mg/L). Com 48 horas após os procedimentos de aclimação, os tratamentos dos peixes não aclimatados e aclimatados em 30 minutos (NOAC e AC30, respectivamente) mostraram redução dos valores glicêmicos com retorno à normalidade (semelhante aos valores basais) às 48 e 72h, respectivamente. No entanto, para o tratamento de aclimação lenta (AC60), com 24 horas após procedimento, houve redução significativa na glicemia comparado aos demais tratamentos, permanecendo essa hipoglicemia até o final do período de análise, não retornando à normalidade.

Mais tardiamente que a glicose, o pico de lactato no sangue foi observado em 24 horas após os procedimentos de aclimação para todos os tratamentos. Mas ressalta-se que o lactato para o tratamento (AC60) foi maior ($p < 0,05$) comparado aos demais tratamentos em todas as horas de análise. Ao final das 96 horas de análise, nenhum dos tratamentos obteve valores de retorno à normalidade.

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos do sangue de tambaqui *Colossoma macropomum* referente ao primeiro experimento referente a avaliação dos procedimentos de aclimação

	NOAC	30AC	60AC
	Glicose (mg/dL)		
Basal	32,00±2,96	32,00±2,96	32,00±2,96
01h	71,67±6,18Ab	69,50±3,59Ab	107,83±25,60Aa
24h	40,67±3,99Ba	30,17±4,30Bb	20,50±8,50Bc
48h	32,33±10,93Ba	37,50±5,56Ba	24,83±4,37Bb
72h	30,17±3,37Ba	33,83±8,47Ba	24,67±5,73Bb
96h	36,67±9,29Ca	35,00±8,64Ca	23,83±6,23Bb
Retorno	48h	72h	NO<
<i>p-value</i>	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
	Lactato (mg/dL)		
Basal	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
01h	0,00±0,00Bb	0,00±0,00Bb	1,28±0,17Ba
24h	1,80±1,09Ab	1,73±0,59Ab	3,28±0,34Aa
48h	1,13±0,16Ab	1,15±0,19Ab	2,83±0,72Aa
72h	1,02±0,19Ab	1,17±0,24Ab	2,60±0,90Aa
96h	1,08±0,07Ab	1,08±0,07Ab	2,70±0,57Aa
Retorno	NO>	NO>	NO>
<i>p-value</i>	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de análise de variância em parcelas subdivididas ao tempo; NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Em relação a parte vermelha do sangue, na primeira hora de análise, a contagem total de eritrócitos foi igual entre todos os tratamentos, mas houve redução acentuada

desse valor a partir das 48h no tratamento AC60. Para o percentual de hematócrito, o tratamento AC60 diferiu dos demais com menores valores, na primeira hora e posteriormente nas horas de 48 a 96 h, corroborando a menor quantidade de eritrócitos observada. Com o parâmetro de hemoglobina, houve diferença entre todos os tratamentos com maiores valores para AC60 e menores para NOAC no tempo de 1 hora, porém observou-se redução de hemoglobina no decorrer do tempo para todos os tratamentos, finalizando com valores abaixo da normalidade (tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros eritrocitários do sangue de tambaqui *Colossoma macropomum* referente ao primeiro experimento de avaliação do protocolo de aclimação

	NOAC	30AC	60AC
Eritrócitos (cel/ μ L x 10^6)			
Basal	0,72$\pm$0,12	0,72$\pm$0,12	0,72$\pm$0,12
01h	1,26 $\pm$ 5,99Aa	1,14 $\pm$ 5,33Aa	1,30 $\pm$ 48,08Aa
24h	1,19 $\pm$ 3,19Ab	1,03 $\pm$ 4,75Ab	1,89 $\pm$ 24,28Aa
48h	1,54 $\pm$ 6,47Aa	1,88 $\pm$ 6,11Aa	0,74 $\pm$ 3,40Bb
72h	1,63 $\pm$ 8,71Aa	1,92 $\pm$ 7,18Aa	0,74 $\pm$ 5,21Bb
96h	1,17 $\pm$ 2,87Aa	1,76 $\pm$ 1,71Aa	0,72 $\pm$ 5,34Bb
Retorno	NO>	NO>	48h
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Hematócrito (%)			
Basal	21,42$\pm$2,07	21,42$\pm$2,07	21,42$\pm$2,07
01h	31,84 $\pm$ 4,80Aa	33,73 $\pm$ 6,08Aa	23,43 $\pm$ 2,80Ab
24h	23,62 $\pm$ 7,91Ba	27,50 $\pm$ 4,80Aa	23,21 $\pm$ 4,41Aa
48h	27,13 $\pm$ 3,31Aa	24,80 $\pm$ 4,68Ba	21,31 $\pm$ 1,38Aa
72h	27,56 $\pm$ 2,69Aa	24,31 $\pm$ 3,83Ba	18,81 $\pm$ 2,78Ab
96h	23,25 $\pm$ 3,87Ba	25,29 $\pm$ 3,05Ba	19,41 $\pm$ 2,35Ab
Retorno	96h	NO>	01h
p-value	p>0,05	p<0,05	p<0,05
Hemoglobina (g/dL)			
Basal	3,85$\pm$0,56	3,85$\pm$0,56	3,85$\pm$0,56
01h	11,79 $\pm$ 2,57Ac	14,97 $\pm$ 1,95Ab	18,47 $\pm$ 1,91Aa
24h	6,00 $\pm$ 1,80Aa	6,26 $\pm$ 1,78Ba	4,72 $\pm$ 1,54Ba
48h	3,23 $\pm$ 0,70Aa	3,91 $\pm$ 0,68Ca	3,28 $\pm$ 0,88Ba
72h	3,27 $\pm$ 0,72Aa	3,81 $\pm$ 0,75Ca	3,81 $\pm$ 1,28Ba
96h	2,76 $\pm$ 0,69Aa	2,69 $\pm$ 0,68Ca	2,43 $\pm$ 0,63Ba
Retorno	NO<	NO<	NO<
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de análise de variância em parcelas subdivididas ao tempo; Retorno: Indica houve ou não retorno dos valores aos níveis basais pelo teste-t; NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

O volume corpuscular médio foi maior nos tratamentos NOAC e AC30 quando comparados ao AC60 nas 24 primeiras horas. A partir das 48 horas, os valores de VCM retornaram ao basal para o tratamento AC30, enquanto os demais tratamentos permaneceram com seus valores alterados (tabela 9), sendo os maiores valores de

VCM para os peixes do tratamento AC60. Em relação ao HCM, houve aumento acentuado na primeira hora em todos os tratamentos comparado ao valor basal e apenas os peixes não submetidos a aclimação (NOAC) mostraram retorno aos valores basais em 48 horas para este parâmetro. Para o tratamento AC60, este novamente não retornou à normalidade ao final das 96 horas de análise. Para o CHCM, a maior elevação de valores ocorreu no tratamento AC60, mas com redução após 24 h, sendo semelhante aos demais tratamentos, mas abaixo dos valores basais.

Tabela 9. Índices hematimétricos do sangue de tambaqui *Colossoma macropomum* referente ao primeiro experimento de avaliação do protocolo de aclimação

	NOAC	30AC	60AC
	VCM (fL)		
Basal	281,13±48,91	281,13±48,91	281,13±48,91
01h	612,8±295,6Aa	726,7±377,8Aa	418,8±188,8Cb
24h	419,0±196,4Ba	614,8±220,9Aa	258,0±72,5Bb
48h	406,2±162,2Ba	277,7±103,5Bb	572,6±35,9Aa
72h	413,2±189,3Ba	289,1±137,8Bb	507,1±72,7Aa
96h	431,1±175,8Ba	290,3±54,5Bb	537,7±86,3Aa
Retorno	NO>	48h	NO>
p-value	p<0,05	p>0,05	p<0,05
	HCM (pg)		
Basal	53,71±6,99	53,71±6,99	53,71±6,99
01h	237,14±147,66Aa	325,05±168,34Aa	340,34±179,91Aa
24h	108,90±50,83Ba	152,47±96,94Aa	52,02±22,64Bb
48h	49,15±22,28Ca	28,84±23,08Bb	87,35±22,51Ba
72h	50,31±26,50Cb	37,84±29,74Cb	94,82±32,41Ba
96h	48,02±10,01Cb	30,16±6,29Cc	66,93±18,33Ba
Retorno	48h	NO<	NO>
p-value	p>0,05	p<0,05	p<0,05
	CHCM (%)		
Basal	18,30±3,69	18,30±3,69	18,30±3,69
01h	38,12±11,59Ab	46,80±15,58Ab	79,96±13,91Aa
24h	31,93±21,71Aa	23,42±8,25Aa	21,59±11,40Ba
48h	11,85±1,87Ab	16,20±4,12Aa	15,34±4,26Ba
72h	11,80±2,14Ab	15,72±2,19Aa	19,53±9,07Ba
96h	12,85±7,04Aa	10,95±3,82Aa	13,04±5,03Ba
Retorno*	NO<	NO<	NO<
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de análise de variância em parcelas subdivididas ao tempo; NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Para as células de defesa, na primeira hora de análise sanguínea, houve aumento significativo em neutrófilos, linfócitos e basófilos para o tratamento sem aclimação (NOAC) em comparação aos demais (AC30 e AC60). Em particular o tratamento AC60 apresentou os menores valores de linfócitos tanto na primeira hora

quanto ao passar das horas (1~96h). Além da linfocitopenia, este mesmo tratamento também mostrou redução de basófilos diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (NOAC e AC30) a partir das 48 horas. O tratamento AC60 também apresentou o maior número de células imatura em relação aos demais tratamentos a partir das 24h (tabela 10).

Tabela 10. Leucócitos e trombócitos do sangue de tambaqui *Colossoma macropomum* referente ao primeiro experimento de avaliação do protocolo de aclimação.

	NOAC	30AC	60AC	NOAC	30AC	60AC
	Trombócitos			Neutrófilo		
Basal	1,59±0,13	1,59±0,13	1,59±0,13	1,45±0,12	1,45±0,12	1,45±0,12
01h	0,70±0,28Ab	0,54±0,17Cc	0,77±0,52Ba	3,40±1,30Aa	1,98±0,54Bb	1,96±0,35Ab
24h	0,30±0,07Cc	0,47±0,06Bb	1,78±0,60Aa	1,60±0,52Ba	1,36±0,74Ba	1,59±0,25Aa
48h	0,19±0,04Cc	0,94±0,27Aa	0,70±0,20Bb	2,76±0,44Bb	4,25±1,04Aa	0,58±0,13Bc
72h	0,27±0,07Cc	0,71±0,13Aa	0,52±0,02Cb	2,16±0,53Bb	3,99±1,12Aa	0,93±0,38Bc
96h	0,38±0,07Bc	0,84±0,35Aa	0,52±0,06Cb	2,67±0,42Ba	3,50±0,51Aa	0,91±0,24Bb
Retorno	NO<	NO<	NO<	NO>	NO>	NO<
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
	Linfócitos			Basófilo		
Basal	1,32±0,14	1,32±0,14	1,32±0,14	0,19±0,04	0,19±0,04	0,19±0,04
01h	3,04±1,65Aa	2,50±0,01Aa	0,11±0,04Bb	0,46±0,33Aa	0,17±0,05Bb	0,23±0,06Ab
24h	2,48±0,60Aa	1,51±0,63Aa	0,13±0,04Bb	0,47±0,23Aa	0,34±0,13Ba	0,22±0,14Aa
48h	2,81±0,55Aa	2,29±0,19Aa	0,18±0,05Bb	0,50±0,12Ab	0,93±0,06Aa	0,05±0,02Bc
72h	2,58±0,56Aa	3,54±0,21Aa	0,44±0,05Ab	0,61±0,16Ab	0,81±0,27Aa	0,06±0,02Bc
96h	3,06±0,11Aa	3,00±0,80Aa	0,44±0,02Ab	0,66±0,06Ab	0,85±0,31Aa	0,06±0,01Bc
Retorno	NO>	NO>	NO<	NO>	NO>	NO<
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
	Monócitos			Célula imatura		
Basal	0,11±0,01	0,11±0,01	0,11±0,01	0,07±0,01	0,07±0,01	0,07±0,01
01h	0,35±0,27Aa	0,25±0,11Aa	0,38±0,10Aa	0,31±0,18Bc	1,95±0,28Aa	1,11±0,38Cb
24h	0,17±0,06Bb	0,25±0,13Ab	0,46±0,19Aa	2,13±0,57Ab	1,91±0,11Ab	8,51±0,74Aa
48h	0,20±0,03Bb	0,31±0,08Aa	0,18±0,05Bb	0,29±0,09Bc	1,65±0,45Ab	2,74±0,16Ba
72h	0,18±0,04Bb	0,30±0,05Aa	0,18±0,02Bb	0,58±0,13Bc	1,07±0,46Bb	2,08±0,34Ca
96h	0,16±0,02Bb	0,26±0,03Aa	0,17±0,01Bb	0,68±0,02Bb	0,98±0,46Bb	2,22±0,51Ca
Retorno*	NO>	NO>	NO>	NO>	NO>	NO>
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de análise de variância em parcelas subdivididas ao tempo; NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas, todos os leucócitos foram expressos em quantidade de células/microlitro vezes 10⁴

Analisando os dados em conjunto desse experimento, o procedimento lento de aclimação (AC60) mostrou maiores alterações impedindo a mitigação do efeito do estresse de transporte, já a aclimação rápida apresentou resultados semelhantes a manejo de não aclimatar, levantando dúvidas quanto sua utilização como manejo profilático.

6.2 Experimento 2. protocolos de aclimação e Suscetibilidade infecciosa

Considerando que no experimento anterior, a aclimação em 30 minutos se comportou semelhante ao não aclimatado, optou-se por desafiar os peixes quanto a presença de patógenos na água para avaliar se realmente não aclimatar seria uma opção pós o estresse de transporte. Como resultado, observou-se que na primeira hora após a aclimação, a glicose aumentou em todos os peixes, no entanto, os peixes dos tanques contaminados apresentaram maiores valores se comparado aos animais dos tanques estéreis (Figura 5). Não foram observadas diferenças entre os diferentes procedimentos de aclimação (rápida, lenta ou não aclimatar), com valores variando de 89 a 99 mg/dL. Ao longo do período experimental, houve redução da glicose em 72 h para valores próximos ao basal.

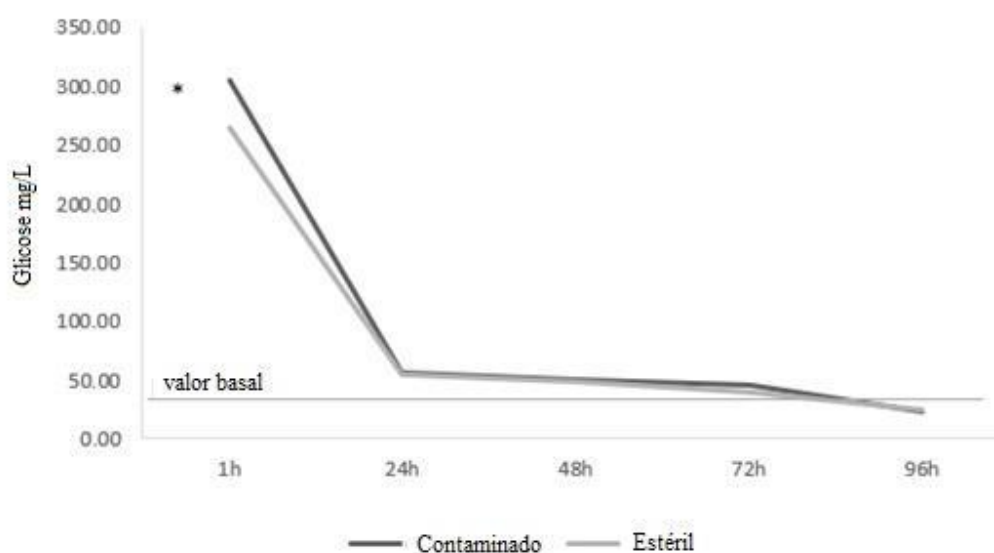


Figura 5. Valores de glicose (média $\pm$ desvio padrão, mg/dL) de *Colossoma macropomum* de tanques contaminados e estéreis ao longo das horas (01 a 96 horas). O símbolo (*) significa diferença estatística entre tanques contaminados e estéreis ao longo do tempo.

Assim como a glicose, houve um aumento no cortisol, em especial no procedimento de aclimação lenta (60AC), aproximadamente 300% em comparação com o valor basal. Nenhum dos tratamentos promoveu o retorno dos níveis de cortisol aos valores antes do estresse. Além disso, os peixes dos tanques contaminados apresentaram níveis de cortisol mais elevados do que os do grupo estéril (tabela 11).

Tabela 11. Valores de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) após procedimentos de aclimação ao longo das horas em tanques contaminados ou estéreis.

	Aclimação			Tanques	
	NOAC	30AC	60AC	Contaminado	Estéril
Basal	26.00±3.26			26.00±3.26	
01h	33.21±9.37Bb	33.21±9.37Bb	103.64±21.66Ab	64.46±26.20a	51.32±12.94b
24h	38.51±9.01Bb	38.51±9.01Bb	69.27±5.53Bb		
48h	62.88±8.77Ab	62.88±8.77Ab	80.88±13.85Ab		
72h	52.88±2.62Ab	52.88±2.62Ab	95.31±3.83Ab		
96h	46.34±6.09Bb	46.34±6.09Bb	74.01±24.52Bb		
Return	NO>	NO>	NO>		
p-value	p<0.05	p<0.05	p<0.05		

Letras diferentes na linha (minúsculas) e na coluna (maiúsculas) significam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p<0,05$), Basal: Valores basais antes do procedimento de aclimação, NÃO (>): não retornou e terminou acima dos valores basais, NÃO (<): não retornou e terminou abaixo dos valores basais.

Todos os peixes, independentemente do procedimento de aclimação, mostraram níveis de lactato acima do valor basal ($0,0 \text{ g/dL}$) na primeira hora de análise. No entanto, observando longo do tempo, a presença do patógeno influenciou no efeito da aclimação para os parâmetros de lactato ($p<0,01$) e na proteína plasmática total ($p<0,01$). Em especial, o grupo de peixes expostos aos patógenos apresentaram níveis mais elevados de lactato e proteína plasmática total (PPT), principalmente para o procedimento de aclimação lenta (AC60 em 48 h; Figura 6A e B).

Para o grupo de animais não aclimatados, essa resposta do lactato foi observada apenas em 72 h. Os peixes não expostos ao patógeno, a partir da 1 h de análise, mostrou gradativa redução no valor de lactato ao longo do tempo, embora não tenham retornado ao valor basal. Destaca-se o procedimento de aclimação por 30 minutos, que mesmo em tanques contaminados, os animais mostraram valores de lactato semelhantes aos peixes dentro dos tanques livre de patógeno.

Observou-se redução da proteína plasmática total ao longo do tempo, no entanto, a redução mais acentuada foi observada em peixes expostos a patógenos, principalmente para os animais aclimatados por 60 minutos, seguido pelos peixes não aclimatados. Os peixes que não foram expostos ao patógeno apresentaram redução gradual, atingindo valores basais em 72 h. Ressalta-se que peixes em 30AC que foram expostos a patógenos apresentaram valores de proteína plasmática total semelhantes aos encontrados em peixes não expostos a patógenos.

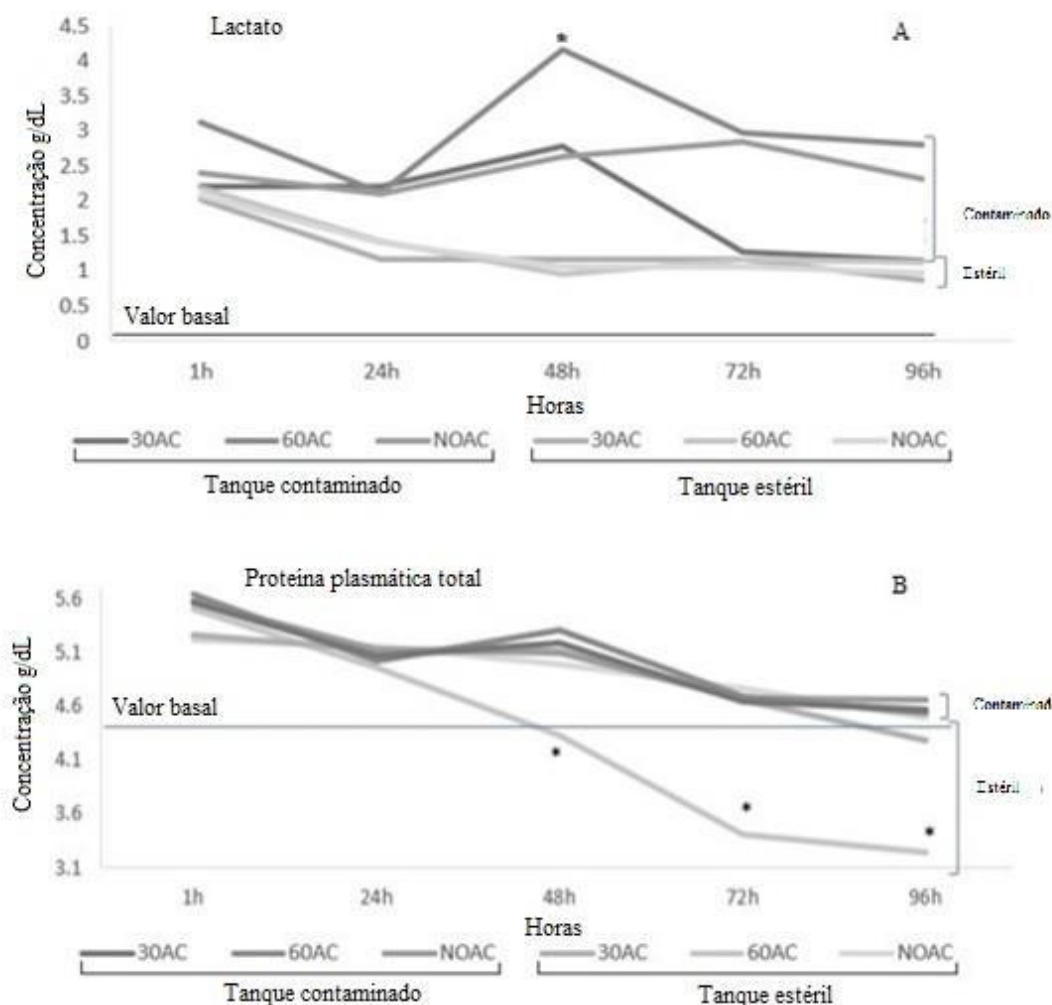


Figura 6. A: Valores de lactato (mg/dL) entre os tratamentos em dois tipos diferentes de tanques (contaminados e estéreis) ao longo do tempo; B: Valores de proteína plasmática total (g/dL) entre os tratamentos em dois tipos diferentes de tanques (contaminados e estéreis) ao longo do tempo.

Eritrócitos, hematócrito e hemoglobina dos peixes submetidos ao procedimento lento (60AC) não retornaram aos valores basais mesmo após 96 h pós estresse por transporte, independentemente se exposto ou não ao patógeno. A presença dos patógenos alterou os valores desses três parâmetros a partir de 48 h. Nos tanques contaminados, independente do procedimento de aclimação (NOAC, 30AC, 60AC), os valores de eritrócitos não retornaram aos valores basais e os parâmetros de hematócrito e hemoglobina só retornaram aos valores basais em 96 h (tabela 12).

Tabela 12. Concentração de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina do sangue de tambaqui *Colossoma macropomum* após diferentes procedimentos de aclimação ao longo das horas entre tanques contaminados e estéreis.

	Tanques contaminados			Tanques estéreis		
	NOAC	30AC	60AC	NOAC	30AC	60AC
Eritrócitos (Cel/ μ L x 10 ⁶)						
Basal	1.20±0.10	1.20±0.10	1.20±0.10	1.20±0.10	1.20±0.10	1.20±0.10
01h	1.58±0.20AbX	1.60±0.36AaX	1.82±0.29AaX	1.48±0.19AbX	1.68±0.23AaX	1.86±0.30AaX
24h	1.57±0.11AaX	1.50±0.33AaX	1.29±0.28BbX	1.47±0.28AaX	1.43±0.29BaX	1.39±0.35BaX
48h	1.30±0.19BaX	1.35±0.18BaX	1.06±0.22BbX	1.41±0.17AaX	1.32±0.26CaX	1.33±0.27BaY
72h	1.25±0.35BaX	1.29±0.37BaX	1.08±0.30BaX	1.17±0.22BaX	1.15±0.37CaX	1.37±0.11BaY
96h	1.30±0.13BaX	1.34±0.23BaX	0.98±0.19BbX	1.21±0.22BaX	1.19±0.35CaX	1.40±0.17BaY
Retorno	NO(>)	NO(>)	NO(<)	72h	72h	NO(>)
p-valor	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05
Hematocrit (%)						
Basal	30.60±3.00	30.60±3.00	30.60±3.00	30.60±3.00	30.60±3.00	30.60±3.00
01h	33.67±1.94AaX	32.35±1.90BaX	33.44±1.74AaX	32.59±1.77BaX	32.89±1.62BaX	32.89±1.76AaX
24h	34.15±1.74AaX	34.07±1.76AaX	33.97±1.83AaX	33.89±1.69AaX	34.00±1.87AaX	33.15±1.90AaX
48h	34.96±1.88AaX	34.13±1.79AaX	35.09±2.10AaX	32.04±1.54BaY	30.59±1.47CaY	32.21±1.26AaY
72h	33.64±1.63AbX	29.43±1.31CbX	34.93±1.39AaX	30.00±1.73CbY	29.22±1.48CbX	32.59±1.54AaY
96h	30.71±2.02BbX	30.27±1.60CbX	35.08±1.73AaX	30.92±1.27CaX	29.77±1.31CaX	30.33±1.12BaY
Retorno	96h	72h	NO(>)	72h	48h	96h
p-valor	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Hemoglobina (g/dL)						
Basal	10.01±2.40	10.01±2.40	10.01±2.40	10.01±2.40	10.01±2.40	10.01±2.40
01h	12.93±1.55AbX	13.89±1.61AaX	14.17±1.54CaX	12.79±1.25AbX	14.56±1.39AaX	14.70±1.40AaX
24h	12.07±1.67AbX	13.18±1.33AbX	16.78±1.71BaX	12.60±1.94AaX	10.48±1.52BbY	14.26±1.49AaY
48h	12.82±1.45AbX	12.77±1.65AbX	16.74±1.99BaX	11.03±1.50BbY	9.90±1.53BbY	14.89±1.63AaY
72h	12.69±0.71AbX	12.08±1.02AbX	18.26±1.74AaX	10.27±1.63BbY	11.78±1.02BbX	15.06±0.74AaY
96h	11.42±1.33AbX	10.14±1.42BbX	18.87±1.53AaX	11.43±1.30BbX	10.97±1.18BbX	13.77±1.02AaY
Retorno	96h	96h	NO(>)	48h	24h	NO(>)
p-valor	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05

Letras diferentes na linha (minúscula), coluna (maiúscula) e entre os grupos contaminado e estéril (igual - XX; diferente - XY) diferença estatística média pelo teste de Tukey, NO(>): não retornou e terminou acima dos valores basais , NO(<): não retornou e terminou abaixo dos valores basais

Os peixes submetidos a aclimação rápida ou não aclimatados (30AC ou NOAC) nos tanques estéreis não diferiram significativamente entre os três parâmetros citados anteriormente (eritrócitos, hematócrito e hemoglobina). No entanto, o grupo 30AC apresentou o retorno mais precoce aos valores basais entre 24 e 48 h. A análise dos índices hematimétricos revelou que os peixes do tratamento 60AC em tanques contaminados apresentaram altos valores de VCM, HCM e CHCM a partir de 24 h, mas não retornaram aos valores basais ao final do experimento (96 h) (tabela 13).

Tabela 13. Índices hematimétricos do sangue de tambaqui *Colossoma macropomum* após diferentes procedimentos de aclimação ao longo das horas entre tanques contaminados e estéreis.

	Tanques contaminados			Tanques estéreis		
	NOAC	30AC	60AC	NOAC	30AC	60AC
VCM (fL)						
Basal	267,12±44,34	267,12±44,34	267,12±44,34	267,12±44,34	267,12±44,34	267,12±44,34
01h	216,23±36,18BaX	212,23±36,18AaX	186,44±21,83CaX	222,06±23,45AaX	195,05±32,39BaX	180,34±27,51BaX
24h	219,35±20,28BaX	235,21±44,86AaX	274,60±58,47BaX	239,20±53,34AaX	246,87±54,17AaX	252,68±71,20AaX
48h	276,55±52,57AbX	256,87±38,65AbX	344,26±67,51AaX	231,32±34,01AaX	239,91±48,38AaX	249,15±37,23AaY
72h	287,70±85,24AbX	230,58±27,97AcX	357,28±45,32AaX	266,00±59,52AaX	247,12±38,62AaY	239,35±27,38AaY
96h	237,91±23,79BbX	235,01±56,82AbX	369,46±79,35AaX	262,05±45,52AaX	269,97±79,39AaX	219,41±25,91AaY
Retorno	48h	24h	NO(>)	24h	24h	NO(<)
p-valor	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05
HCM (pg)						
Basal	85,65±20,73	85,65±20,73	85,65±20,73	85,65±20,73	85,65±20,73	85,65±20,73
01h	77,15±17,95BaX	92,88±33,92AaX	79,62±15,83DaX	87,20,11,20AaX	88,54±17,97BaX	80,76±15,93BaX
24h	77,33±11,32BbX	91,13±19,08AbX	135,66±31,21CaX	89,69±25,79AbX	75,67±16,99BbX	110,27±39,30AaY
48h	101,53±22,30AbX	95,13±12,18AbX	163,68±34,19BaX	79,33±13,23AbX	77,44±17,47BbX	116,43±25,61AaY
72h	109,17±34,50AbX	95,25±28,86AbX	182,91±62,57AaX	91,24±25,03AaX	99,17±16,90AaX	110,51±11,56AaY
96h	88,65±13,47BbX	78,57±20,91AbX	197,03±36,07AaX	97,88±25,38AaX	101,32±36,98AaX	100,00±16,30AaY
Retorno	01h	01h	NO(>)	01h	01h	96h
p-valor	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
CHCM (%)						
Basal	33,56±9,71	33,56±9,71	33,56±9,71	33,56±9,71	33,56±9,71	33,56±9,71
01h	35,67±6,09BaX	43,09±5,79AaX	42,45±4,92DaX	39,29±3,59AaX	45,36±4,06AaX	44,72±3,81AaX
24h	35,46±5,53BbX	38,75±4,15AbX	49,38±4,21BaX	37,17±5,17AbX	30,81±3,92BbX	43,12±5,12AaY
48h	36,63±3,01AbX	37,39±4,32AbX	47,88±6,84CaX	34,47±4,79AbX	32,38±4,89BbX	46,34±5,76AaY
72h	37,76±1,74AbX	41,01±2,72AbX	52,38±5,68AaX	34,38±6,29AaX	40,32±2,72AaX	46,24±1,78AaY
96h	37,17±3,20AbX	33,61±5,19BbX	53,97±5,81AaX	37,09±5,12AaX	36,98±4,79AaX	45,40±3,04AaY
Retorno	01h	96h	NO(>)	01h	96h	NO(>)
p-valor	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05

Letras diferentes na linha (minúscula), coluna (maiuscula) e entre os grupos contaminado e estéril (igual - XX; diferente - XY) diferença estatística média pelo teste de Tukey, NO(>): não retornou e terminou acima dos valores basais , NO(<): não retornou e terminou abaixo dos valores basais.

Para os leucócitos, na primeira hora após o procedimento de aclimação, independentemente do procedimento usado, os trombócitos, linfócitos e basófilos apresentaram valores reduzidos em relação aos valores basais. Apesar dessa redução, os peixes aclimatados rapidamente (30AC) em tanques contaminados ou estéreis apresentaram os maiores valores de trombócitos em 96 h em comparação aos demais tratamentos. Um efeito semelhante foi observado em linfócitos, onde 30AC e NOAC em condições estéreis apresentaram os maiores valores desta célula em 96 h.

Nos animais aclimatados lentamente (60AC), a redução destas células foi acentuada a partir das 48 h não retornando aos valores basais (tabela 14). Outras células de defesa, como neutrófilos e monócitos, LG-PAS e células imaturas

apresentaram comportamento oposto, aumentando na primeira hora, mas reduzindo ao longo do tempo.

Tabela 14. Valores de leucócitos do tambaqui *Colossoma macropomum* após diferentes procedimentos de aclimação ao longo das horas entre tanques contaminados e estéreis.

	Tanques contaminados			Tanques estéreis		
	NOAC	30AC	60AC	NOAC	30AC	60AC
Trombócitos						
Basal	1.67±0.41	1.67±0.41	1.67±0.41	1.67±0.41	1.67±0.41	1.67±0.41
01h	1.28±0.46AaX	1.41±0.33CaX	1.53±0.49AaX	1.32±0.22AaX	1.42±0.28BaX	1.55±0.16AaX
24h	0.97±0.13AaX	1.15±0.30CaX	0.63±0.22BbX	1.20±0.14AY	1.11±0.60BX	0.54±0.13CbX
48h	0.48±0.08CbX	1.17±0.25CaX	0.21±0.05CcX	0.53±0.08BcX	1.30±0.26BaX	0.82±0.20BbY
72h	0.65±0.19BbX	1.45±0.18BaX	0.37±0.11CcX	0.51±0.11BcX	1.64±0.50AaX	0.94±0.14BbY
96h	1.26±0.37AbX	1.69±0.26AaX	0.60±0.11BcX	1.03±0.19AbX	1.75±0.57AaX	1.34±0.15AbY
Retorno	96h	72h	NO<	NO<	48h	96h
<i>p-valor</i>	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Linfócitos						
Basal	8.35±1.24	8.35±1.24	8.35±1.24	8.35±1.24	8.35±1.24	8.35±1.24
01h	4.70±1.79AaX	4.09±1.53BaX	2.71±1.76BbX	3.52±1.56BbX	7.89±1.74AaY	3.60±0.91BbY
24h	3.24±0.77BaX	3.76±0.83BaX	2.06±0.71BbX	1.70±0.57CbY	3.75±1.90BaX	1.59±0.44CbY
48h	2.40±0.52BbX	3.09±0.63BaX	1.07±0.20CcX	1.39±0.16CbY	7.77±1.76AaY	2.49±0.70CbY
72h	4.50±1.05AX	5.41±0.59AaX	2.40±0.74BX	3.17±0.69BbX	7.92±2.45AaY	1.98±0.47CcX
96h	5.02±0.96AX	6.82±1.16AX	7.51±0.96AX	8.74±0.16AaY	8.70±2.61AaY	5.26±0.98AbY
Retorno	NO<	96h	96h	96h	48h	NO<
<i>p-valor</i>	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05
Monócitos						
Basal	0.84±0.36	0.84±0.36	0.84±0.36	0.84±0.36	0.84±0.36	0.84±0.36
01h	1.50±0.64AbX	1.96±1.23AbX	2.96±1.34AaX	1.65±0.44AbX	1.08±0.60AbY	2.25±0.90AaX
24h	1.64±0.09AbX	1.16±0.28AcX	2.54±0.45AaX	1.36±0.31AbX	0.47±0.42BcY	2.12±0.69AaX
48h	1.96±0.31AbX	1.48±0.21AbX	2.75±0.48AaX	1.98±0.32AaX	1.11±0.20AbY	1.63±0.59BaY
72h	0.21±0.19BcX	0.75±0.18BbX	2.36±0.58AaX	1.27±0.28AaY	0.69±0.22BaX	0.92±0.18BaY
96h	0.59±0.36BbX	0.45±0.11BbX	1.38±0.27BaX	0.43±0.17BbX	0.51±0.19BbX	0.90±0.31BaY
Retorno	NO<	NO<	NO>	NO<	NO<	72h
<i>p-valor</i>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05
Neutrófilos						
Basal	2.41±1.06	2.41±1.06	2.41±1.06	2.41±1.06	2.41±1.06	2.41±1.06
01h	10.99±2.22AaX	9.67±2.89AaX	12.11±1.38AaX	9.22±1.28AaX	7.57±2.29AbY	12.43±2.83AaX
24h	9.34±1.49AaX	9.04±2.40AaX	7.46±1.66BbX	10.13±2.03AaX	9.40±2.75AaX	7.49±1.67CbX
48h	7.22±1.42BaX	8.14±1.10AaX	4.85±0.90CbX	8.15±1.04AaX	3.84±0.76BbY	7.55±1.19CaY
72h	9.56±2.91AaX	6.38±0.62BaX	4.29±1.13CbX	6.26±1.19BbY	2.40±0.73BcY	9.87±0.93BaY
96h	4.62±0.59CaX	5.64±1.05BaX	5.12±0.92CaX	2.04±0.65CbY	2.33±0.56BbY	6.33±0.51CaX
Retorno	NO>	NO>	NO>	96h	72h	NO>
<i>p-valor</i>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05
Basófilos						
Basal	0.33±0.39	0.33±0.39	0.33±0.39	0.33±0.39	0.33±0.39	0.33±0.39
01h	0.12±0.23BaX	0.02±0.06CaX	0.01±0.02CaX	0.00±0.00DaX	0.00±0.00BaX	0.05±0.07DaX
24h	1.58±0.22AaX	0.60±0.15AbX	1.46±0.45BaX	1.25±0.24BbX	0.10±0.09BcY	2.25±0.52AaY
48h	1.93±0.53AaX	0.43±0.11AbX	1.78±0.62BaX	2.07±0.26AaX	0.32±0.09AcX	1.24±0.15BbX
72h	0.24±0.20BbX	0.22±0.03BbX	2.44±0.65AaX	0.69±0.13CaY	0.24±0.12AbX	0.52±0.15CaY
96h	0.10±0.14BbX	0.20±0.08BbX	0.95±0.17BaX	0.64±0.25CbY	0.16±0.04AcX	1.12±0.35BaX
Retorno	72h	48h	NO>	NO>	48h	NO>
<i>p-valor</i>	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
LG PAS +						
Basal	0.02±0.03	0.02±0.03	0.02±0.03	0.02±0.03	0.02±0.03	0.02±0.03

01h	0.25±0.23A	0.30±0.17A	0.20±0.21A	0.31±0.16A	0.07±0.07A	0.11±0.17A
24h	0.33±0.11A	0.33±0.09A	0.23±0.11A	0.04±0.02B	0.12±0.17A	0.07±0.01A
48h	0.15±0.07A	0.12±0.06B	0.15±0.05A	0.09±0.04B	0.00±0.00A	0.07±0.01A
72h	0.07±0.07B	0.00±0.00B	0.12±0.02A	0.15±0.03A	0.00±0.00A	0.06±0.04A
96h	0.11±0.06A	0.11±0.04B	0.02±0.01A	0.14±0.06A	0.01±0.01A	0.17±0.16A
Retorno	NO>	NO>	96h	NO>	01h	01h
p-valor	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Células imaturas						
Basal	0.16±0.14	0.16±0.14	0.16±0.14	0.16±0.14	0.16±0.14	0.16±0.14
01h	0.22±0.23	0.19±0.17	0.19±0.22	0.12±0.14	0.17±0.16	0.16±0.24
24h	0.72±0.17	0.14±0.08	0.42±0.10	0.00±0.00	0.48±0.96	0.40±0.09
48h	0.63±0.30	0.25±0.17	0.48±0.08	0.38±0.05	0.16±0.09	0.31±0.04
72h	0.06±0.09	0.12±0.04	0.47±0.18	0.14±0.02	0.14±0.08	0.37±0.04
96h	0.06±0.05	0.14±0.13	0.25±0.08	0.16±0.08	0.12±0.03	0.21±0.02
Retorno	NO<	72h	NO>	72h	48h	NO>
p-valor	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05

Letras diferentes na linha (minúscula), coluna (maiúscula) e entre os grupos contaminado e estéril (igual - XX; diferente - XY) diferença estatística média pelo teste de Tukey, NO(>): não retornou e terminou acima dos valores basais, NO(<): não retornou e terminou abaixo dos valores basais, todos os glóbulos brancos foram expressos na "célula/ μ L x 10⁴"

As concentrações de sódio, potássio e cloro foram significativamente reduzidas na primeira hora, independentemente do procedimento de aclimação (30AC, 60AC e NOAC) ou da presença dos patógenos. No entanto, os peixes dos tanques contaminados mostraram menos sódio e potássio no sangue. Em 96 h, destaca-se que apenas os peixes submetidos a aclimação por 30 minutos demonstraram o retorno dos sais no sangue aos valores basais. Em relação a pressão de dióxido de carbono e o pH, estes parâmetros apresentaram comportamentos opostos a partir da primeira hora, com aumento da pressão CO₂ e redução do pH sanguíneo. Após todo período de análise, apenas os animais submetidos a aclimação por 30 minutos dentro dos tanques estéreis obtiveram o retorno da normalidade para o pH sanguíneo (tabela 15).

Tabela 15. Gás e íons do sangue do tambaqui *Colossoma macropomum* após diferentes procedimentos de aclimação ao longo das horas entre tanques contaminados e estéreis.

	Tanques contaminados			Tanques estéreis		
	NOAC	30AC	60AC	NOAC	30AC	60AC
Basal	Na (mEq/L)					
	141,00±0,82	141,00±0,82	141,00±0,82	141,00±0,82	141,00±0,82	141,00±0,82
01h	115,00±1,73CaX	105,10±2,18DcX	111,00±2,60BbX	119,67±3,04EaY	120,33±3,04CaY	121,00±0,87CaY
24h	131,00±3,46BaX	130,00±1,73CaX	109,33±5,63BbX	135,33±2,18DaY	121,33±6,50CcY	133,00±0,87BbY
48h	139,67±0,50AaX	133,00±0,87BbX	110,67±7,86BcX	139,67±1,32CaX	138,33±0,50BaY	135,00±2,60AbY
72h	139,00±0,50AaX	140,33±4,36AaX	110,33±2,18BbX	142,33±1,80BaY	137,33±4,36BbY	136,33±0,50AbY
96h	140,00±0,87AaX	141,33±2,78AaX	113,00±1,73AbX	148,33±6,50AaY	141,33±0,50AbX	137,00±2,60AcY
Return	NO(<)	96h	NO(<)	NO(>)	96h	NO(<)
p-value	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05
K (mL/mm³)						
Basal	3,50±0,42	3,50±0,42	3,50±0,42	3,50±0,42	3,50±0,42	3,50±0,42
01h	2,02±0,02DbX	3,54±0,37BaX	2,25±0,22DbX	2,50±0,52CbX	2,70±3,90CaX	2,33±0,50DbX
24h	3,25±0,56BcX	4,00±0,09AbX	4,65±0,30BaX	4,07±0,44BbX	3,90±0,09BbX	4,30±0,77AaX
48h	3,77±0,49AbX	3,95±0,04AbX	7,15±0,82AaX	4,20±0,09AbX	4,23±0,56AaX	3,87±0,13BbX

72h	4,40±0,43AaX	3,30±0,23BbX	4,50±0,09BaX	4,35±0,39AaX	4,20±0,23AaX	3,30±0,43CbX
96h	3,65±0,04CbX	3,40±0,40BbX	4,25±0,04CaX	3,90±0,09BaX	3,50±0,09BbX	3,05±0,39CcX
Return	NO(>)	96h	NO(>)	NO(>)	96h	NO(<)
p-value	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05
Cl (mEq/L)						
Basal	121,67±2,87	121,67±2,87	121,67±2,87	121,67±2,87	121,67±2,87	121,67±2,87
01h	85,00±0,87CbX	86,00±4,33CaX	85,00±3,46BbX	85,00±2,60CbY	87,00±1,73CaY	86,00±1,73CbX
24h	100,33±4,77BcX	102,50±1,32BbX	88,11±9,84AaX	106,00±2,59BbY	91,67±6,61BbX	103,33±3,50BaY
48h	111,67±7,37AbX	106,00±0,87BbX	85,00±6,76AaX	114,00±0,87AaY	108,33±8,54AaY	103,33±8,67BbY
72h	112,00±2,60AaX	113,33±8,23AbX	82,33±0,58CaX	114,00±4,82AaX	112,33±8,23AaY	113,67±1,73AbY
96h	114,00±2,29AbX	113,67±2,18AbX	88,00±1,73AaX	113,00±0,50AaX	114,33±3,04AbX	109,00±1,73BcY
Return	NO(<)	NO(<)	NO(<)	NO(<)	NO(<)	NO(<)
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
pH						
Basal	6,82±0,05	6,82±0,05	6,82±0,05	6,82±0,05	6,82±0,05	6,82±0,05
01h	6,50±0,01CbX	6,50±0,01CaX	6,50±0,01CbX	6,50±0,01DbY	6,50±0,01DaY	6,50±0,01DbX
24h	6,50±0,01CcX	6,57±0,07BbX	6,62±0,02AaX	6,56±0,05CbY	6,56±0,05CbX	6,53±0,05CaY
48h	6,54±0,06BbX	6,63±0,19AbX	6,55±0,08BaX	6,65±0,07BaY	6,59±0,10BaY	6,54±0,05CbY
72h	6,67±0,13AaX	6,63±0,29AbX	6,56±0,42BaX	6,62±0,10BaX	6,60±0,09BaY	6,71±0,10AbY
96h	6,68±0,04AbX	6,65±0,14AbX	6,56±0,05BaX	6,70±0,23AaX	6,81±0,25AbX	6,62±0,10BcY
Return	NO(<)	NO(<)	NO(<)	NO(<)	96h	NO(<)
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05
PCO ²						
Basal	27,15±1,05	27,15±1,05	27,15±1,05	27,15±1,05	27,15±1,05	27,15±1,05
01h	64,33±0,50AaX	51,56±5,90AaX	61,33±2,65AaX	51,70±5,48AaX	65,53±11,95AaX	51,70±5,48AaX
24h	42,27±5,97BaX	44,00±15,38AaX	39,53±4,72BaX	45,50±7,24AaX	42,35±0,39BaX	45,50±7,24AaX
48h	39,80±4,96BaX	48,40±13,07AaX	39,90±3,83BaX	41,73±8,00AaX	39,20±9,71BaX	41,73±8,00AaX
72h	33,80±3,99BaX	56,77±5,72AbX	45,40±8,32AbX	31,57±5,97BaX	21,93±13,39CaY	31,57±5,97BaX
96h	24,47±2,93CaX	49,10±5,52AaX	47,90±15,17AaX	20,53±1,43CaY	18,00±5,72CaY	20,53±1,43CaY
Return	NO(<)	NO(>)	NO(>)	NO(<)	NO(<)	NO(<)
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Letras diferentes na linha (minúscula), coluna (maiúscula) e entre os grupos contaminado e estéril (igual - XX; diferente - XY) diferença estatística média pelo teste de Tukey, NO(>): não retornou e terminou acima dos valores basais , NO(<): não retornou e terminou abaixo dos valores basais.

Em resumo, ao final do experimental (96 h), corroborou-se que aclimação lenta de 60 minutos provoca intensas alterações hematológicas como manejo pós transporte. Contrariamente, os peixes submetidos ao procedimento de aclimação rápida (30AC) foi o tratamento que apresentou o maior número de parâmetros sanguíneos retornando aos valores basais (52% dos parâmetros retornam a normalidade) (tabela 16) mesmo comparando ao tratamento NOAC.

Tabela 16. Lista resumida dos parâmetros sanguíneos que retornaram à normalidade especificado com a hora em que ele ficou igual ao valor basal.

	Tanques contaminados			Tanques estéreis		
	NOAC	30AC	60AC	NOAC	30AC	60AC
Glicose	-	-	-	-	-	-
Lactato	-	-	-	-	-	-
Proteína	-	-	-	72	72	72
Hemoglobina	96	96	-	48	24	-
Hematócrito	96	72	-	72	48	96
Eritrócitos	-	-	-	72	72	-
VCM	48	24	-	-	24	-
HCM	01	01	-	01	01	96
CHCM	01	96	-	01	96	-
Trombócitos	96	72	-	-	48	96
Linfócitos	-	96	96	96	48	-
Monócitos	-	-	-	-	-	72
Neutrófilos	-	-	-	96	72	-
Basófilos	72	48	-	-	48	-
LG PAS +	-	-	96	-	01	01
Célula Im.	-	72	-	72	48	-
Na	-	96	-	-	96	-
K	-	96	-	-	96	-
Cl	-	-	-	-	-	-
pH	-	-	-	-	96	-
PCO ²	-	-	-	-	-	-
Retorno*	7	11	2	9	16	6

Todos os valores de 01 a 96 significam o tempo em horas para retornar para os valores basais do sangue, Todas as marcações com tracinho (-) indicam que este parâmetro não retornou a normalidade ao final de 96 horas *Retorno: número de parâmetros sanguíneos que retornaram para os valores basais, Na: sódio, K: potássio, Cl: cloreto, PCO²: pressão de gás carbônico, Célula Im: célula imatura

Complementando os resultados anteriores, a análise de componentes principais corroborou a diferença entre as condições contaminada e estéril sobre os efeitos dos parâmetros sanguíneos dividindo estes em dois grupos distintos: estéril à esquerda e contaminado à direita (Figura 6) e destacou as posições opostas entre estéril 30AC e contaminado 60AC. Os principais componentes (PC) foram PC1 (77%) e PC2 (11%), com as maiores cargas positivas para de eritrócitos e VCM e negativa para os trombócitos na PC1 (tabela 17).

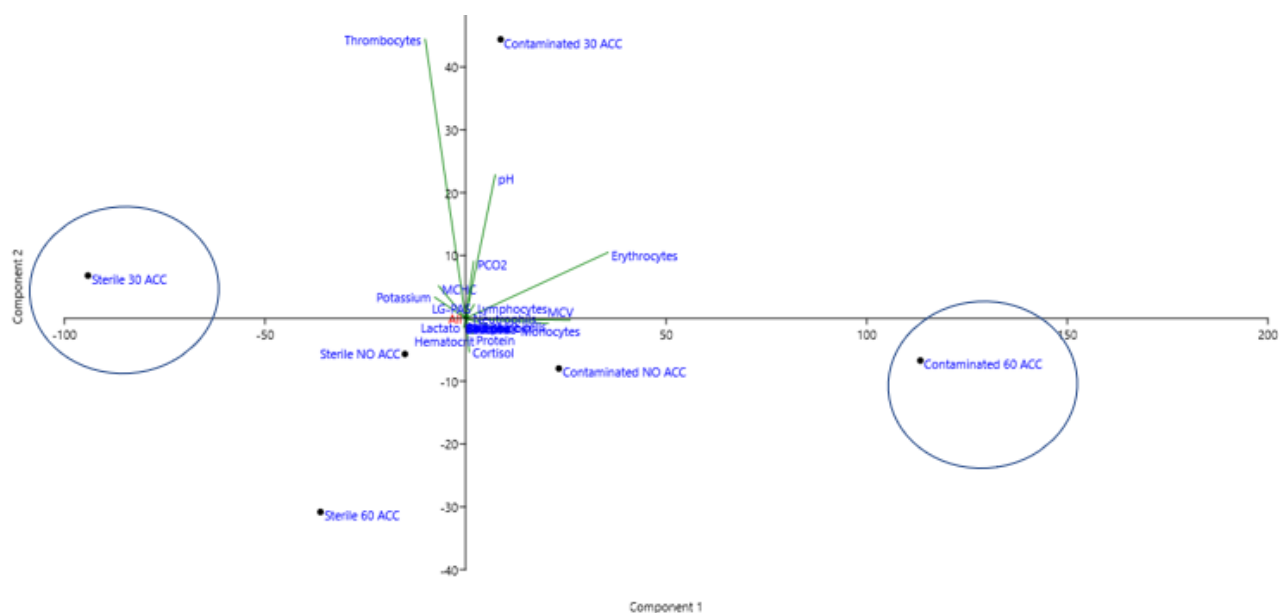


Figura 6. Análise dos componentes principais dos parâmetros sanguíneos do tambaqui *Colossoma macropomum* após diferentes procedimentos de aclimação entre tanques contaminados e estéreis em 96h.

Tabela 17. Cargas da Análise de Componentes Principais (PCA 96h) dos parâmetros sanguíneos do tambaqui *Colossoma macropomum* após diferentes procedimentos de aclimação entre tanques contaminados e estéreis.

	PC 1	PC 2
Glicose (g/dL)	0.010	-0.006
Lactato (g/dL)	-0.009	-0.028
Proteína (g/dL)	0.217	-0.043
Cortisol (g/dL)	0.017	-0.101
Hematócrito (%)	0.033	-0.046
Hemoglobina (g/dL)	-0.002	-0.002
Eritrócitos (cel/ μ L x 106)	0.675	0.199
VCM (fL)	0.495	-0.005
HCM (pg)	0.008	-0.002
CHCM (%)	-0.127	0.098
Sódio	0.003	-0.005
Potássio	-0.146	0.064
Cloro	-0.002	-0.003
pH	0.140	0.434
PCO2	0.039	0.172
Trombócitos	-0.191	0.844
Linfócitos	0.041	0.042
Monócitos	0.392	-0.015
Neutrófilos	0.020	-0.002
Basófilo	0.003	-0.007
LG-PAS	0.012	0.007
Células imaturas	0.011	0.002

PC: principal componente, Na: sódio, K: potássio, Cl: cloreto, PCO₂: pressão de gás carbônico, Célula Im: célula imatura, todos os glóbulos brancos foram expressos na “célula x 104/ μ L”

Além das alterações sanguíneas em todos os tratamentos, mortalidade foi observada apenas nos tanques contaminados. O procedimento de aclimação lenta (60AC) resultou na maior mortalidade acumulada (aproximadamente 20%) (Figura 7), e maior número de peixes com sinais clínicos tal como escurecimento da pele, micélios no corpo, locais hemorrágicos, erosão da nadadeira e ulceração da pele dorso lateralmente (Figura 8; Tabela 18). Após o procedimento microbiológico, a bactéria patogênica *A. hydrophila* foi re-isolada de todos os peixes moribundos com sinais clínicos e o gênero e a espécie foram confirmados pelo método MALDI-TOF (escore 2,02).

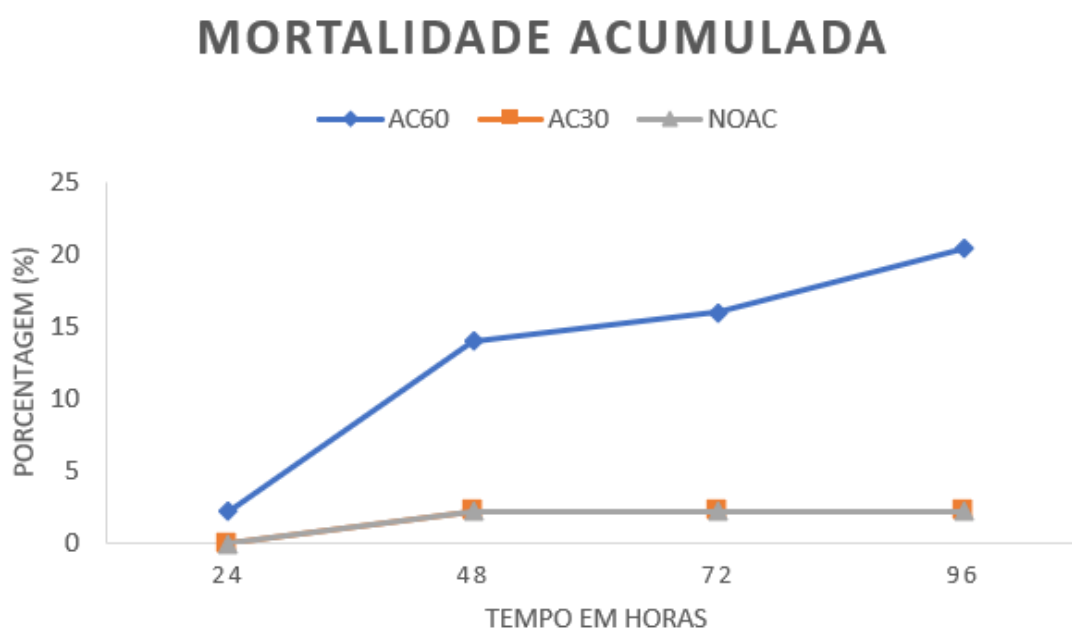


Figura 7. Mortalidade acumulada de tambaqui *Colossoma macropomum* submetido a diferentes procedimentos de aclimação em tanques contaminados com *Aeromonas hydrophila* e *Saprolegnia parasitica*. NOAC: sem procedimento de aclimação, 30AC: aclimação rápida em 30min, 60AC: aclimação longa em 60min.

Tabela 18. Prevalência dos sinais clínicos do tambaqui *Colossoma macropomum* submetido a diferentes procedimentos de aclimação em tanques contaminados e estéreis.

	Tanques contaminados			Tanques estéreis		
	NOAC	AC30	AC60	NOAC	AC30	AC60
Letargia	0,00±0.00b	0,00±0.00b	26,67±10.89a	0,00±0.00a	0,00±0.00a	0,00±0.00a
Pele escura	2,22±3,14b	4,44±6,29b	100,00±0,00a	0,00±0.00a	0,00±0.00a	4,44±3,14a
O. ocular	0,00±0,00b	0,00±0,00b	13,33±5,44a	0,00±0.00a	0,00±0.00a	0,00±0.00a
N. errática	0,00±0,00b	0,00±0,00b	22,22±12,57a	0,00±0.00a	0,00±0.00a	0,00±0.00a
Fungo P.	0,00±0,00b	6,67±5,44b	100,00±0,00a	0,00±0.00a	0,00±0.00a	0,00±0.00a
P.H.	2,22±3,14b	2,22±3,14b	100,00±0,00a	0,00±0.00a	0,00±0.00a	0,00±0.00a
Úlceras	0,00±0,00b	6,67±5,44b	91,11±8,31a	0,00±0.00a	0,00±0.00a	4,44±3,14a
C.N.	2,22±3,14b	6,67±5,44b	95,56±3,14a	2,22±3,14a	6,67±5,44a	13,33±5,44a
Necrose M.	0,00±0,00a	0,00±0,00a	08,89±8,31a	0,00±0.00a	0,00±0.00a	0,00±0.00a

O. ocular – opacidade ocular; N. errática - natação errática; Fungo P. - Fungo na pele; P.H. – pontos hemorrágicos – erosão das nadadeiras; Necrose M. – necrose da musculatura.

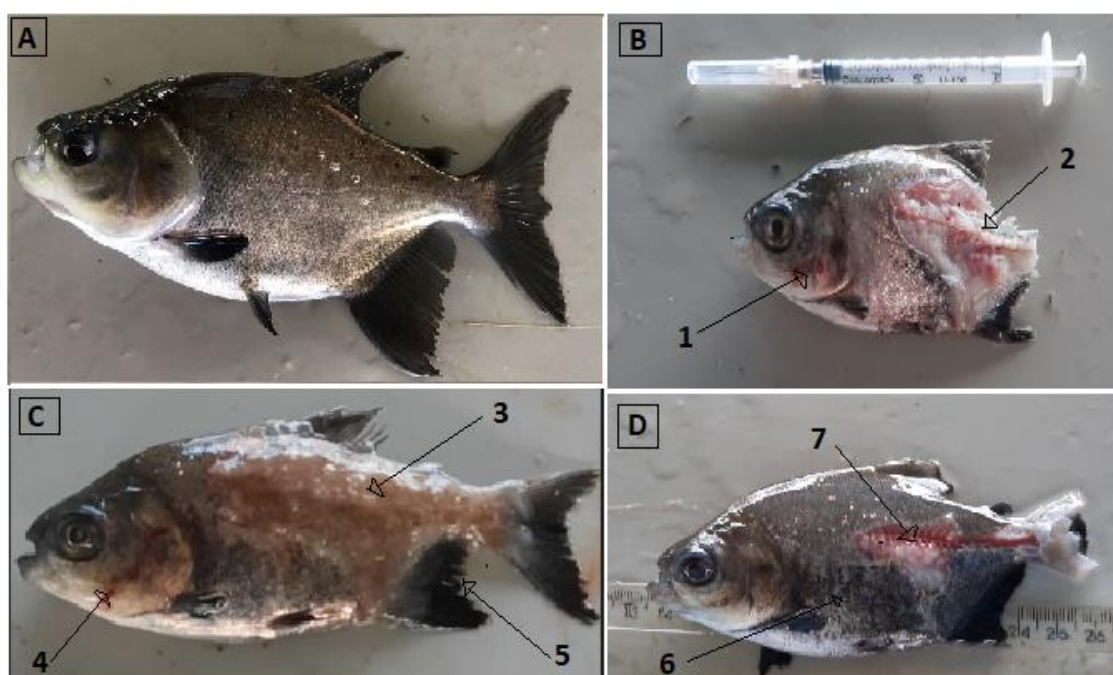


Figura 8. Sinais clínicos de Tambaqui *Colossoma macropomum* submetido a procedimento de aclimação e exposto a patógenos: A – Peixe saudável sem sinais clínicos, B – (1) pontos hemorrágicos (2) necrose da musculatura; C – (3) fungos no corpo (4) pontos hemorrágicos (5) erosão das barbatanas; D – (6) pele mais escura, (7) Úlceras.

6.3 Experimento 3. Influência do manejo e intensidade de estresse

A inadequação de uso do procedimento lento de aclimação observado nos experimentos anteriores, levantou a questão se o procedimento de aclimação por si seria estressante e se isso dependeria da intensidade de estresse. No experimento 3 foi observado que intensidade do estresse promovido altera diferentemente a bioquímica do sangue, sendo que estresse mais intenso de oito horas de transporte promoveu maiores valores de glicemia ($60,50 \pm 41,78$ mg/dL) e lactato ($1,81 \pm 1,01$ mg/dL) comparado às 4 horas de transporte ($50,93 \pm 18,44$ e $1,27 \pm 0,49$ mg/dL) (tabela 19).

Independentemente do estresse aplicado o tratamento com aclimação de 30 minutos (AC30) promoveu o retorno aos valores basais em 48 horas (tabela 19), sendo o único tratamento que promoveu retorno aos valores basais no grupo estressado por 8 horas, e retorno mais rápido dos valores basais da glicemia no grupo estressado por 4h. Contrariamente no grupo que recebeu estresse mais intenso (8 h de transporte), o tratamento simulado (SIMU) promoveu os maiores valores de glicemia ($160,67 \pm 25,75$ mg/dL) não retornando aos valores basais ao final das 96 horas.

Para lactato, observa-se maiores valores dentro de 48 h nos peixes transportados por 4h e entre 24h-48h nos peixes submetidos a 8h de transporte simulado, comparado aos demais tratamentos. Tanto lactato quanto proteína plasmática total não retornaram aos valores basais ao final das 96 horas independente do tratamento. A proteína plasmática total também não diferiu entre os tempos de transporte ou os procedimentos de aclimação testados (tabela 19).

Tabela 19. Parâmetros bioquímicos do sangue de tambaqui *Colossoma macropomum* após diferentes tempos de transporte e manejos de aclimação.

	TRANSPORTE 4h bloco1			TRANSPORTE 8h bloco 2		
	NOAC	SIMU	AC30	NOAC	SIMU	AC30
Glicose (mg/dL)						
Basal	$38,60 \pm 2,52$	$38,60 \pm 2,52$	$38,60 \pm 2,52$	$38,60 \pm 2,52$	$38,60 \pm 2,52$	$38,60 \pm 2,52$
Bloco		$50,93 \pm 18,44X$			$60,50 \pm 41,78Y$	
01h	$85,22 \pm 21,36Aa$	$84,89 \pm 19,02Aa$	$89,44 \pm 10,83Aa$	$128,00 \pm 23,00Ab$	$160,67 \pm 25,75Aa$	$134,56 \pm 11,19Ab$
24h	$45,00 \pm 09,23Ba$	$45,78 \pm 10,67Ba$	$55,00 \pm 15,15Ba$	$50,11 \pm 07,25Ba$	$54,44 \pm 12,80Ba$	$60,89 \pm 12,06Ba$
48h	$44,78 \pm 11,23Ba$	$46,78 \pm 13,69Ba$	$38,78 \pm 10,85Ca$	$36,56 \pm 07,52BCa$	$35,11 \pm 06,57Ca$	$37,44 \pm 17,39Ca$
72h	$39,00 \pm 07,84Ba$	$40,00 \pm 06,84Ba$	$35,56 \pm 06,52Ca$	$32,56 \pm 04,33Ca$	$37,89 \pm 06,84Ca$	$36,89 \pm 05,51Ca$
96h	$37,67 \pm 06,28Ba$	$38,44 \pm 14,12Ba$	$37,56 \pm 08,47Ca$	$31,67 \pm 05,68Ca$	$32,56 \pm 05,64Ca$	$38,11 \pm 05,64Ca$
Retorno	72h	72h	48h	NO <	NO <	48h
p-value	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05
Lactato (mg/dL)						
Basal	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Bloco		$1,27 \pm 0,49X$			$1,81 \pm 1,01Y$	
01h	$0,80 \pm 0,00Ba$	$1,08 \pm 0,40Ba$	$0,91 \pm 0,33Ba$	$1,16 \pm 0,49Ba$	$1,11 \pm 0,47Ba$	$1,11 \pm 0,47Aa$
24h	$1,60 \pm 0,74Aa$	$2,11 \pm 0,98Aa$	$1,88 \pm 1,51Aa$	$1,61 \pm 0,79ABb$	$3,64 \pm 0,84Aa$	$1,82 \pm 0,68Ab$
48h	$1,03 \pm 0,66Bb$	$2,42 \pm 1,07Aa$	$1,16 \pm 0,66Bb$	$1,77 \pm 1,30Ab$	$4,58 \pm 0,40Aa$	$2,60 \pm 1,47Ab$
72h	$0,88 \pm 0,16Ba$	$1,37 \pm 0,82Ba$	$0,82 \pm 0,04Ba$	$1,11 \pm 0,52Ba$	$1,89 \pm 0,82Ba$	$1,24 \pm 0,59Aa$

96h	0,93±0,22Ba	1,14±0,54Ba	0,86±0,09Ba	0,98±0,28Ba	1,68±1,23Ba	0,92±0,21Aa
Retorno	NO >	NO >	NO >	NO >	NO >	NO >
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Proteína plasmática total (mg/dL)						
Basal	5,88±0,73	5,88±0,73	5,88±0,73	5,88±0,73	5,88±0,73	5,88±0,73
Bloco	4,96±0,23X			4,90±0,22X		
01h	5,14±0,21Aa	5,07±0,53Aa	5,43±0,44Aa	5,07±0,47Aa	4,76±0,30Aa	5,01±0,33Aa
24h	5,02±0,29Aa	4,89±0,36Aa	5,12±0,38Aa	5,29±0,38Aa	5,07±0,47Aa	4,98±0,07Aa
48h	5,29±0,28Aa	4,87±1,63Aa	5,09±0,47Aa	4,89±0,38Aa	4,89±0,36Aa	4,87±0,26Aa
72h	4,80±0,51Aa	4,69±0,55Aa	4,89±0,43Aa	5,13±0,37Aa	4,64±0,55Aa	4,94±0,30Aa
96h	4,62±0,51Ba	4,51±0,41Aa	5,00±0,42Aa	4,51±0,41Bb	4,44±0,38Aa	5,04±0,30Aa
Retorno	NO <	NO <	NO <	NO <	NO <	NO <
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas e entre os blocos (X Y) indicam diferença estatística pelo teste de análise de variância em blocos subdivididos ao tempo; NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Nas células vermelhas, os peixes submetidos às 8 horas de transporte apresentaram aumento no número de eritrócitos totais, hemoglobina e percentual de hematócrito (tabela 20). Contudo, independentemente do tempo de transporte, o tratamento simulado (SIMU) promoveu aumento de hematócrito, nas primeiras 1 h no grupo dos peixes transportados por 4h, e no total de eritrócitos nas 24 h no grupo dos peixes transportados por 8h quando comparados aos tratamentos NOAC e AC30. O percentual de hematócrito em particular não retornou ao valor basal ao final das 96 horas. Destaca-se o tratamento AC30 no grupo estressado por 4 horas que apresentou o retorno mais rápido dos valores de hemoglobina (24h).

Tabela 20. Células vermelhas do sangue de tambaqui *Colossoma macropomum* após diferentes tempos de transporte e manejos de aclimação.

	TRANSPORTE 4h			TRANSPORTE 8h		
	NOAC	SIMU	AC30	NOAC	SIMU	AC30
Hematócrito (%)						
Basal	29,07±3,15	29,07±3,15	29,07±3,15	29,07±3,15	29,07±3,15	29,07±3,15
Bloco	24,68±3,16X			29,01±6,23Y		
01h	28,15±3,12Ab	32,78±1,79Aa	28,04±2,65Ab	30,46±2,65Ab	37,53±6,75Aa	33,96±4,08Ab
24h	26,22±1,20Aa	26,67±1,73Ba	25,56±1,94Aa	37,55±6,54Aa	39,05±5,21Aa	38,65±3,22Aa
48h	24,95±4,11Ba	21,11±2,85Ca	21,78±2,73Ba	22,44±1,13Ba	24,22±3,80Ba	23,22±1,20Ba
72h	23,11±1,45Ba	21,78±3,38Ca	22,00±6,48Ba	23,22±1,86Ba	24,56±3,38Ba	25,00±1,94Ba
96h	23,56±1,33Ba	21,56±2,60Ca	25,22±2,26Ba	25,22±1,72Ba	25,67±3,24Ba	24,33±2,69Ba
Retorno	NO <	NO <	NO <	NO <	NO <	NO <
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Eritrócitos totais (cel/uL x 10 ⁶)						
Basal	1,71±0,81	1,71±0,81	1,71±0,81	1,71±0,81	1,71±0,81	1,71±0,81
Bloco	1,85±0,19X			2,28±0,15Y		
01h	1,91±0,32Aa	1,82±0,46Aa	1,93±0,31Aa	2,00±0,42Ba	2,42±0,39Ba	2,12±0,55Ba
24h	2,19±0,31Aa	2,16±0,46Aa	2,18±0,50Aa	3,42±1,79Ab	4,38±0,58Aa	3,09±0,59Ab
48h	1,76±0,48Aa	1,93±0,25Aa	1,79±0,26Aa	1,98±0,36Ba	2,20±0,39Ba	2,01±0,25Ba
72h	1,72±0,29Aa	1,75±0,41Aa	1,68±0,23Aa	1,74±0,36Ba	2,14±0,41Ba	1,70±0,19Ba
96h	1,70±0,79Aa	1,58±0,23Aa	1,64±0,29Aa	1,71±0,51Ba	1,66±0,23Ca	1,66±0,23Ba
Retorno	48h	72h	48h	72h	96h	72h

<i>p-value</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	Hemoglobina (g/dL)					
Basal	5,96±0,53	5,96±0,53	5,96±0,53	5,96±0,53	5,96±0,53	5,96±0,53
Bloco		6,75±1,91X			8,56±2,24Y	
01h	9,17±0,60Ab	11,51±0,92Aa	9,65±1,02Ab	10,53±1,13Ab	12,99±1,52Aa	10,71±1,22Ab
24h	7,64±1,34Aa	7,47±1,05Aa	6,12±1,50Bb	9,36±2,67Ab	12,05±1,43Aa	9,00±1,10Bb
48h	4,64±0,85Bb	4,68±1,18Bb	5,98±1,23Ba	7,88±0,68Bb	9,31±0,69Ba	7,55±0,93Cb
72h	5,63±0,71Ba	5,25±0,87Ba	6,19±0,31Ba	6,87±0,62Bb	8,55±0,87Ba	6,63±0,84Db
96h	5,91±0,59Ba	5,43±0,76Ba	5,97±0,39Ba	5,81±1,47Ca	5,06±1,11Ca	6,13±0,46Da
Retorno	72h	NO <	24h	96h	NO <	96h
<i>p-value</i>	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05

Diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas e entre os blocos (X Y) indicam diferença estatística pelo teste de análise de variância em blocos subdivididos ao tempo; NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) entre os tempos de transporte. Porém, com 8 horas de estresse por transporte, o tratamento simulado na primeira hora de análise apresentou o maior valor de VCM. Com 24 horas após o estresse, os peixes do tratamento NOAC (independente do tempo de transporte 04 ou 08h) ainda são estatisticamente iguais a primeira hora de análise. No entanto, quando observado dentro do tempo de transporte de 8 horas, o tratamento NOAC apresenta valores maiores comparado aos demais tratamentos (AC30 e SIMU) (tabela 21).

Tabela 21. Índices hematimétricos do sangue de tambaqui *Colossoma macropomum* após diferentes tempos de transporte e manejos de aclimação.

	TRANSPORTE 4h			TRANSPORTE 8h		
	NOAC	SIMU	AC30	NOAC	SIMU	AC30
	VCM					
Basal	166,33±41,96	166,33±41,96	166,33±41,96	166,33±41,96	166,33±41,96	166,33±41,96
Bloco		138,94±18,67X			138,26±22,22X	
01h	159,36±42,06Aa	159,74±40,40Aa	171,20±57,01Aa	151,61±31,84Ab	193,30±59,25Aa	148,86±37,67Ab
24h	122,64±23,13Aa	130,09±37,47Ba	122,41±27,32Aa	144,71±83,23Aa	129,69±17,39Ba	129,41±27,85Aa
48h	154,72±68,44Aa	111,22±21,96Ba	124,21±24,95Aa	116,75±22,66Aa	113,51±28,11Ba	117,32±17,27Aa
72h	137,64±25,38Aa	129,39±31,15Ba	133,59±41,49Aa	139,13±32,53Aa	117,45±31,15Ba	147,80±14,41Aa
96h	141,50±50,30Aa	138,01±15,82Ba	144,86±36,78Aa	160,28±50,60Aa	108,66±35,73Bb	147,93±15,16Aa
Retorno	48h	NO<	72h	72h	NO<	72h
<i>p-value</i>	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05
	HCM					
Basal	38,07±16,13	38,07±16,13	38,07±16,13	38,07±16,13	38,07±16,13	38,07±16,13
Bloco		38,97±11,24X			40,82±7,93X	
01h	49,37±9,16Aa	68,10±22,17Aa	50,97±7,90Aa	54,87±13,65Aa	54,64±9,41Aa	53,57±14,23Aa
24h	35,29±6,18Aa	36,58±11,53Ba	29,86±12,04Ba	50,46±13,62Aa	28,28±7,20Bb	30,60±9,24Bb
48h	27,27±5,75Ba	24,49±6,22Ba	34,10±9,83Ba	40,81±7,72Ba	43,22±6,56Ba	38,26±7,32Ba
72h	33,40±6,49Ba	31,46±8,75Ba	37,48±5,30Ba	41,20±10,28Ba	40,70±8,75Ba	39,30±6,16Ba
96h	36,00±13,35Ba	34,95±6,10Ba	37,55±8,15Ba	37,79±16,36Ba	31,06±8,12Ba	37,63±6,35Ba
Retorno	24h	24h	24h	48h	48h	24h
<i>p-value</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	CHCM					
Basal	20,83±3,54	20,83±3,54	20,83±3,54	20,83±3,54	20,83±3,54	20,83±3,54

Bloco	33,94±6,71X			35,95±7,72X		
01h	30,92±4,84Aa	28,59±2,14Ba	29,86±9,40Ba	29,31±4,77Ba	29,41±6,29Ba	32,09±5,44Aa
24h	35,19±5,83Aa	36,22±4,60Aa	43,61±9,40Aa	44,48±8,18Ba	32,76±5,72Ba	43,74±7,89Aa
48h	51,66±8,90Aa	47,64±3,22Aa	37,92±9,68Aa	28,74±3,74Ba	26,29±5,53Ba	31,21±4,54Aa
72h	41,70±6,60Aa	42,42±9,02Aa	35,41±10,22Aa	33,97±3,46Ba	26,35±9,03Ba	38,21±5,16Aa
96h	40,19±4,21Aa	40,30±7,01Aa	38,52±4,66Aa	46,51±4,59Aa	53,34±5,16Aa	39,83±4,39Aa
Retorno	NO>	NO>	NO>	NO>	NO>	NO>
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas e entre os blocos (X Y) indicam diferença estatística pelo teste de análise de variância em blocos subdivididos ao tempo; NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

6.4 Experimento 4. Gradientes de variação e uso do sal no transporte

Nos experimentos anteriores os tanques receptores tinham a mesma qualidade de água (Tabela 1), sendo a condição ambiental receptora considerada como básica e fria em relação aos tanques originais. No experimento 4 observou-se a influência de outras condições ambientais dos tanques receptores sobre o processo de aclimação utilizado. Como resposta nesse experimento, observou-se que na primeira hora após aclimação, houve o aumento significativo dos valores glicêmicos (variando de 100 a 300%), com destaque para os peixes que não receberam sal durante o transporte e foram aclimatados em tanques com água ácida e fria (tabela 22). Essa diferença continuou dentro de 24 horas, diferindo tanto entre os diferentes tanques no grupo de animais que não recebeu sal, quando aos animais aclimatados em água ácida e fria do grupo com sal no transporte.

Ao longo do tempo, ocorre a redução gradual dos valores glicêmicos em todos os tratamentos (não importa o grupo) ficando abaixo dos valores basais em 96 horas. Esse comportamento é observado para os parâmetros de lactato e proteína plasmática total (elevação inicial e redução gradual), ambos ficando abaixo do basal com 96 horas (tabela 22). Destaca-se que a aclimação dos peixes em água alcalina e quente promoveu os menores aumentos de lactato em 24 h independente do uso ou não de sal no transporte (Tabela 22). Esse comportamento também foi pontuado em valores de cortisol, maiores no grupo de peixes sem uso do sal em específico para os animais aclimatados em água fria e ácida.

Tabela 22. Parâmetros bioquímicos do sangue do tambaqui *Colossoma macropomum* em diferentes parâmetros de água ao longo das horas

	TRANSPORTE COM SAL			TRANSPORTE SEM SAL		
	AQ	BQ	AF	AQ	BQ	AF
	Glicose (mg/dL)					
Basal	43,45±13,72	43,45±13,72	43,45±13,72	43,45±13,72	43,45±13,72	43,45±13,72
01h	164.56±58.51AaX	65.89±23.61AbX	136.44±27,17AaX	132.44±28,61AbX	132.44±52,69AbY	251.33±71,67AaY
24h	64.00±5.72BaX	43.44±10.61AbX	86.00±22,07BaX	81.11±15,34BaY	60.44±24,01BaX	92.44±24,99BaX
48h	51.44±10.28BaX	36.11±5,55BbX	52.89±11,67BaX	60.56±6,85BaX	43.78±5,59BbX	67.33±8,35BaX

72h	30.11±5.26CaX	30.56±4.81BaX	32.89±4.01CaX	29.78±3.88CaX	30.44±3.86CaX	30.67±2.26CaX
96h	27.22±5.30CaX	26.44±4.88BaX	29.33±4.08CaX	25.67±3.56CaX	27.22±3.91CaX	26.89±1.66CaX
Retorno	NO<	NO<	NO<	NO<	NO<	NO<
p-value	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
Lactato (g/dL)						
Basal	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
01h	0.63±0,57AaX	0.61±0,55AaX	0.77±0,55AaX	0.86±0,46BaX	0.70±0,48AaX	0.77±0,55BaX
24h	1.20±0,67AaX	0.56±0,62AbX	1.27±0,73AaX	1.71±0,64AaX	1.24±0,69AbY	1.89±0,73AaX
48h	1.03±0,56AaX	0.51±0,57AaX	0.87±0,61AaX	1.62±0,65AaY	0.13±0,37BbX	1.84±0,18AaY
72h	0.34±0,48BaX	0.27±0,49AaX	0.24±0,45BaX	0.49±0,55BaX	0.33±0,47BaX	0.69±0,62BaX
96h	0.23±0,33BaX	0.34±0,38AaX	0.57±0,50AaX	0.34±0,48BaX	0.23±0,43BaX	0.54±0,61BaX
Retorno	NO<	NO<	NO<	NO<	NO<	NO<
p-value	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
Proteína Plasmática Total (g/dL)						
Basal	4,22±0,14	4,22±0,14	4,22±0,14	4,22±0,14	4,22±0,14	4,22±0,14
01h	4.61±0,19AaX	4.24±0,13AbX	4.78±0,36AaX	5.07±0,21AaY	5.11±0,25AaY	5.29±0,25AaY
24h	4.27±0,23AaX	4.00±0,12AaX	4.52±0,25AaX	4.68±0,22AaX	4.56±0,21BaX	4.84±0,21BaX
48h	4.13±0,13AaX	3.98±0,17AaX	4.12±0,11AaX	4.27±0,13BaX	4.04±0,17BaX	4.26±0,17BaX
72h	3.81±0,12BaX	3.66±0,18BaX	3.80±0,16BaX	3.96±0,13BaX	3.72±0,18CaX	3.89±0,18CaX
96h	3.49±0,15BaX	3.29±0,22BaX	3.51±0,16BaX	3.58±0,17BaX	3.40±0,13CaX	3.56±0,13CaX
Retorno	NO<	NO<	NO<	NO<	NO<	NO<
p-value	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
Cortisol (µg/mL)						
Basal	24,90±8,58	24,90±8,58	24,90±8,58	24,90±8,58	24,90±8,58	24,90±8,58
01h	48.40±1,83BbX	50.96±3,69AbX	93.02±6,65AaX	90.07±28,63AbY	105.32±21,91AbY	161.81±18,32AaY
24h	98.39±6,20AaX	75.83±5,86AbX	88.62±15,74AaX	66.32±16,24AaY	132.32±23,35AaY	140.66±3,76AaY
48h	55.84±19,15BaX	55.18±18,75AaX	57.94±1,64BaX	84.20±23,03AaY	46.35±8,81AbX	94.76±33,35BaY
Retorno	NO(>)	NO(>)	NO(>)	NO(>)	NO(>)	NO(>)
p-value	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

AQ - ácido e quente; BQ – alcalino e quente, AF – ácido e frio, diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas e entre os blocos (X Y) indicam diferença estatística; NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Em relação aos eritrócitos, existe elevação das células vermelhas nos animais que não receberam sal durante o transporte. Apesar da distinta diferença dentro do grupo que usou sal no transporte, os peixes aclimatados em tanques contendo água básica e quente não demonstraram elevação dessas células na primeira hora de análise (tabela 23).

As diferenças nos valores entre os grupos com e sem sal na primeira hora de análise também foram observadas nas concentrações de hemoglobina não importando o tipo da água (quente, fria, ácida ou básica). Ainda dentro deste grupo sem uso de sal durante o transporte, os animais de água ácida e fria apresentaram os maiores valores de hemoglobina. No entanto, após 24 horas, as diferenças não mais existiram e ocorreu uma redução desse parâmetro gradativamente (tabela 23).

Tabela 23. Parâmetros bioquímicos do sangue do tambaqui *Colossoma macropomum* em diferentes parâmetros de água ao longo das horas

	TRANSPORTE COM SAL			TRANSPORTE SEM SAL		
	AQ	BQ	AF	AQ	BQ	AF
Eritrócitos (cel/UI x 10 ⁶)						
Basal	0,70±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23
01h	1.16±0,34AaX	0.88±0,18BaX	1.26±0,38AaX	1.71±0,40AaY	1.69±0,26AaY	1.72±0,26AaY
24h	1.25±0,68AaX	0.98±0,34AaX	1.09±0,30AaX	1.01±0,33AaX	1.37±0,40ABaX	1.09±0,46AaX
48h	1.20±0,74AaX	1.40±0,81AaX	1.01±0,31AaX	0.94±0,32AaX	1.29±0,41ABaX	1.02±0,43AaX
72h	1.43±0,53AaX	1.37±0,54AaX	1.47±0,57AaX	1.19±0,20AaX	1.57±0,53ABaX	1.36±0,40AaX
96h	1.11±0,24AaX	0.81±0,17BaX	0.90±0,14AaX	0.80±0,16BbX	1.17±0,18BabY	1.19±0,19AaY
Retorno	NO(>)	96h	NO(>)	96h	NO(>)	NO(>)
p-value	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
Hematócrito (%)						
Basal	30,18±3,00	30,18±3,00	30,18±3,00	30,18±3,00	30,18±3,00	30,18±3,00
01h	33.67±1,25AaX	32.44±1,64AaX	34.89±1,52AaX	35.62±1,67AaX	34.09±1,13AaX	36.22±1,75AaX
24h	32.44±1,50AaX	31.00±1,76AaX	32.89±1,37AaX	34.51±1,85AaX	33.06±1,26AaX	34.11±1,52BaX
48h	31.44±1,77ABaX	30.22±1,23ABaX	31.67±1,25ABaX	33.51±1,56AaX	32.39±1,45ABaX	31.89±1,29CaX
72h	30.67±1,41BaX	29.89±1,45ABaX	31.00±1,05ABaX	33.40±1,33AaX	31.50±1,05ABaX	32.67±1,94BCaX
96h	29.00±1,70BaX	27.89±0,99BaX	28.89±1,29BaX	31.73±1,21BaX	30.94±1,21BaX	30.67±1,33CaX
Retorno	01h	01h	24h	48h	24h	48h
p-value	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Hemoglobina (g/dL)						
Basal	7,71±1,75	7,71±1,75	7,71±1,75	7,71±1,75	7,71±1,75	7,71±1,75
01h	10.12±2,41AaX	9.52±1,68AaX	12.58±2,26AaX	13.22±2,20AbX	12.36±1,25AbY	22.89±2,30AaY
24h	8.15±2,11AaX	9.74±0,98AaX	11.62±1,19AaX	14.26±3,74AaY	15.35±2,63AaY	15.88±1,14AaY
48h	10.70±2,31AaX	7.68±2,71ABaX	11.25±3,25AaX	11.23±3,64AaX	9.88±1,52ABaX	12.25±3,79ABaX
72h	8.33±2,37AaX	6.63±1,13ABaX	9.70±2,49ABaX	9.86±3,81ABaX	6.92±1,18BaX	10.98±2,41BaX
96h	7.92±2,18AaX	6.65±1,11BaX	8.57±1,32BaX	6.96±0,78BaX	6.63±1,01BaX	7.56±1,94BaX
Retorno	72h	48h	72h	72h	72h	96h
p-value	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

AQ - ácido e quente; BQ – básico e quente, AF – ácido e frio, diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas e entre os blocos (X Y) indicam diferença estatística pelo teste de análise de variância em parcelas sub-subdivididas ao tempo; NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Os peixes que não receberam sal durante o transporte também apresentaram menor volume corpuscular médio e menor hemoglobina corpuscular média na primeira hora. Um destaque especial foi observado para o tratamento com água ácida e fria (independente do grupo: com ou sem sal), demonstrando maiores valores de concentração de hemoglobina corpuscular média, se comparado aos demais tratamentos (tabela 24).

Tabela 24. Índices hematimétricos do tambaqui *Colossoma macropomum* em diferentes parâmetros de água no processo de aclimação ao longo das horas

	Transporte com Sal			Transporte sem Sal		
	AQ	BQ	AF	AQ	BQ	AF
VCM (fL)						
Basal	495,51±212,08	495,51±212,08	495,51±212,08	495,51±212,08	495,51±212,08	495,51±212,08
01h	331.45±124,21AaX	467.88±114,83AaX	301.17±83,59AaX	220.98±59,00AaX	205.61±30,01AaY	216.37±37,50AaX
24h	318.71±119,19AaX	353.50±107,45AaX	330.44±106,27AaX	399.40±207,09AaX	260.76±68,56AaX	364.12±130,18AaX
48h	335.83±147,53AaX	292.57±161,55AaX	341.83±121,36AaX	449.28±272,93AaX	279.58±82,21AaX	376.99±142,59AaX
72h	248.26±99,68AaX	280.11±160,19AaX	248.85±107,70AaX	300.63±59,71AaX	237.50±84,41AaX	267.13±93,87AaX
96h	273.33±62,49AaX	362.05±85,61AaX	331.81±63,10AaX	437.09±111,09AaX	300.73±74,18AbX	263.28±33,32AbX
Retorno	01h	01h	01h	24	96	NO(<)
p-value	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05
HCM (pg)						
Basal	129,55±67,53	129,55±67,53	129,55±67,53	129,55±67,53	129,55±67,53	129,55±67,53
01h	104.99±56,88AaX	132.36±54,75AaX	110.40±40,84AaX	82.41±27,70BabX	75.26±16,85ABbY	137.44±33,82AaX
24h	82.17±36,03AaX	110.56±33,61AaX	116.81±39,87AaX	147.81±31,45AaY	121.80±37,24AaX	167.21±55,14AaX
48h	112.07±50,48AaX	68.39±31,83ABbX	130.49±70,46AaX	154.04±15,55AaX	82.98±25,99AbX	137.14±60,16AabX
72h	73.67±44,15AaX	58.68±29,84BaX	75.19±27,45AaX	83.60±29,23BaX	50.54±22,63BaX	89.49±39,82ABaX
96h	76.25±22,68AbX	85.88±33,08ABabX	111.88±36,74AaX	89.89±28,73BaX	64.50±18,85ABaX	63.63±11,89BaY
Retorno	01h	01h	01h	01h	NO(<)	NO(<)
p-value	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
CHCM (%)						
Basal	25,97±7,16	25,97±7,16	25,97±7,16	25,97±7,16	25,97±7,16	25,97±7,16
01h	30.23±7,73AaX	29.32±4,87AaX	36.26±7,52AaX	37.23±6,42AbX	36.29±3,62AbY	63.08±7,65AaY
24h	25.30±7,04AaX	31.42±2,41AaX	35.36±3,51AaX	41.79±12,40AaX	46.29±6,73AaY	46.62±3,65BaY
48h	34.95±7,56AaX	25.29±8,45ABaX	36.20±10,13AaX	32.47±10,06AaX	29.87±4,33BaX	37.48±11,68BaX
72h	27.30±7,94AaX	21.98±3,90BaX	31.17±7,20AaX	28.74±11,50AaX	20.99±3,92CaX	33.66±8,04BaX
96h	29.00±8,72AaX	23.76±3,88BaX	33.62±8,39AaX	22.00±2,67BaX	21.41±2,91CaX	24.50±5,45CaX
Retorno	01h	NO(<)	48h	48h	48h	48h
p-value	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

AQ - ácido e quente; BQ – básico e quente, AF – ácido e frio, diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas e entre os blocos (X Y) indicam diferença estatística pelo teste de análise de variância em parcelas sub-subdivididas ao tempo; NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Os níveis de sódio na primeira hora de análise foram reduzidos em todos os tratamentos, principalmente nos animais que não receberam sal durante o transporte (diferença significativa entre os grupos). Dentro do grupo de peixes sem uso de sal no transporte a redução foi igual entre os tratamentos. No entanto, para o grupo transportado com sal, os peixes aclimatados em água alcalina e quente (BQ) demonstraram a menor redução de sódio no sangue, seguido dos tratamentos com água ácida e quente (AQ) e água ácida e fria (AF). Um comportamento similar ocorre para o potássio e cloreto, com menor redução para o mesmo tratamento (BQ- água alcalina e quente).

Ja no grupo “sem sal no transporte”, os animais dentro dos tanques com água ácida e quente foram aqueles que tiveram as menores reduções de cloreto. Ao final das

96 horas, apenas os animais dentro dos tanques com água básica e quente mostraram o retorno dos níveis de sódio a normalidade.

Em relação a pressão de gás carbônico e pH sanguíneo, estes parâmetros demonstram comportamentos inversos na primeira hora de análise (aumento da pressão e redução do pH). Tal comportamento (alterações inversas) se mantem de forma gradual ao passar das horas, com a redução da pressão e aumento do pH no sangue. Inicialmente, a acidificação sanguínea foi igual a todos os tratamentos, no entanto, apenas os peixes do grupo que recebeu sal no transporte retornou à normalidade com 96 h. Para a pressão CO₂, este parâmetro permaneceu alterado até o final, com valores acima do basal (tabela 25).

Tabela 25. Concentrações iônicas do sangue do tambaqui *Colossoma macropomum* após diferentes procedimentos de aclimação ao longo das horas entre tanques contaminados e estéreis.

	Transporte com Sal			Transporte sem Sal		
	AQ	BQ	AF	AQ	BQ	AF
Na (mEq/L)						
Basal	134,00±0,82	134,00±0,82	134,00±0,82	134,00±0,82	134,00±0,82	134,00±0,82
01h	118.33±2,05AbX	124.30±3,55ABaX	110.50±0,71BcX	90,40±5,23CaY	92,23±5,54CaY	87,50±12,13BaY
24h	115.00±3,74AaX	119.33±1,16BaX	115.00±2,45ABaX	102.33±3,30BaY	101.00±1,41BaY	108.33±10,40ABaY
48h	110.67±0,94BbX	128.23±3,84AaX	114.67±4,11ABbX	104.67±3,40ABaY	110.33±7,41ABaY	110.33±7,41AaX
72h	116.33±4,03AaX	120.00±6,98ABaX	120.67±4,99AaX	108.67±6,18ABaX	106.33±4,50ABaY	106.33±4,64ABaY
96h	115.33±7,54AbX	131.07±4,35ABaX	118.33±5,25AbX	112.00±2,83AaX	107.67±5,79AaY	110.00±5,10AaX
Retorno	NO(<)	96h	NO(<)	NO(<)	NO(<)	NO(<)
p-valor	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
K (mL/mm ³)						
Basal	5,43±0,12	5,43±0,12	5,43±0,12	5,43±0,12	5,43±0,12	5,43±0,12
01h	5.27±0,17BbX	6.90±0,16BaX	5.13±0,26BbX	3.75±0,61BbY	4.90±0,08BaY	4.20±0,86BaX
24h	5.30±0,24BbX	8.83±0,24AaX	8.25±0,61AaX	3.70±0,50BaY	3.37±0,52CaY	4.30±0,92BaY
48h	4.45±0,04CbX	8.30±0,57AaX	7.90±0,90AaX	7.77±0,92AabY	8.50±0,41AaX	6.85±0,69AbX
72h	8.03±1,30AaX	8.67±0,47AaX	8.10±0,83AaX	8.50±0,24AaX	8.60±0,33AaX	5.17±1,03AbX
96h	8.07±0,74AaX	8.50±0,41AaX	8.75±0,20AaX	7.90±0,90AaX	8.00±0,82AaX	6.80±1,07AaX
Retorno	NO(>)	NO(>)	NO(>)	NO(>)	NO(>)	NO(>)
p-valor	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Cl (mEq/L)						
Basal	124,67±0,29	124,67±0,29	124,67±0,29	124,67±0,29	124,67±0,29	124,67±0,29
01h	88.50±0,41BbX	92.00±1,63CaX	86.50±1,22BbX	100.50±8,57ABaY	86.00±4,90BbY	86.50±3,67BbX
24h	90.50±1,22BcX	130.67±1,89AaX	119.00±2,45AbX	124.33±1,70AaY	112.00±10,23AabY	98.33±1,25BbY
48h	120.00±0,82AaX	117.67±3,86BabX	116.00±1,63AbX	122.67±4,03AaY	114.00±2,45AbX	125.00±4,97AaY
72h	125.00±4,32AaX	127.33±3,30AaX	115.50±0,41AbX	112.00±14,70ABaX	118.00±6,53AaX	123.00±1,63AaY
96h	119.50±0,41AaX	119.00±1,63BaX	117.00±2,45AaX	111.00±0,82BcY	119.33±1,25AbX	127.00±1,63AaY
Retorno	NO(<)	NO(<)	NO(<)	NO(<)	NO(<)	NO(<)
p-valor	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
pH						
Basal	6,76±0,02	6,76±0,02	6,76±0,02	6,76±0,02	6,76±0,02	6,76±0,02

01h	6.50±0,00FaX	6.50±0,00CaX	6.50±0,00CaX	6.50±0,00DaX	6.50±0,00DaX	6.50±0,00FaX
24h	6.51±0,01DaX	6.52±0,01CaX	6.53±0,00BaX	6.53±0,01CaX	6.55±0,02CaY	6.57±0,02DaY
48h	6.57±0,01CaX	6.60±0,03BaX	6.57±0,03BaX	6.56±0,00BbX	6.55±0,01CbY	6.63±0,01CaY
72h	6.73±0,01AbX	6.76±0,00AaX	6.77±0,00AaX	6.67±0,01AaY	6.66±0,02BaY	6.65±0,00BaY
96h	6.76±0,03BaX	6.77±0,01AaX	6.78±0,01AaX	6.70±0,01AbY	6.71±0,01AbY	6.75±0,01AaX
Retorno	72h	72h	72h	NO(<)	NO(<)	96h
p-valor	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05
PCO ²						
Basal	30,64±1,28	30,64±1,28	30,64±1,28	30,64±1,28	30,64±1,28	30,64±1,28
01h	76.80±5,55AaX	76.23±11,41AaX	64.70±4,50AaX	94.00±5,72AaY	78.13±2,81AbX	74.40±7,73AbX
24h	39.20±2,12BbX	50.45±1,43BaX	51.60±2,12BaX	50.95±2,74BbY	46.00±5,72BbX	63.35±2,33BaY
48h	44.00±5,03BaX	43.30±7,27BaX	48.00±7,35BaX	44.00±6,38BaX	52.50±1,22BaX	44.65±1,92BaX
72h	34.57±6,38BaX	40.00±1,80BaX	43.00±4,90BaX	44.00±4,90BaX	37.93±5,80BaX	43.45±6,98BaX
96h	38.57±2,12BbX	40.33±2,62BabX	45.50±1,22BaX	52.50±6,94BaY	39.67±5,91BbX	43.30±4,38BabX
Retorno	NO(>)	NO(>)	NO(>)	NO(>)	NO(>)	NO(>)
p-valor	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

AQ - ácido e quente; BQ – básico e quente, AF – ácido e frio, diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas e entre os blocos (X Y) indicam diferença estatística pelo teste de análise de variância em parcelas sub-subdivididas ao tempo; NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Em resumo, o uso de sal no transporte reduziu as alterações sanguíneas, porém mesmo com a utilização de sal, a aclimação em água ácida e fria provoca maiores alterações sanguíneas nos tambaquis em relação aos demais tratamentos.

Em uma análise conjunta de todos os experimentos e considerando parâmetros de glicose e lactato, relativizou-se os parâmetros em relação ao valor basal para comparar a influência do estresse em relação a indicação do tipo da aclimação. Dessa forma para as variações de glicemia, calculou-se a porcentagem de elevação da glicose (primeira hora de análise) em relação ao valor basal, para permitir a observação das variações nesse parâmetro entre os diferentes experimentos de forma ponderada e não somente com os valores brutos (tabela 26). Observou-se que no primeiro experimento o aumento de glicemia foi menor do que nos demais experimentos, e que o experimento 2 com transporte real, apresentou os maiores valores de glicemia. O transporte simulado apresentou aumentos proporcionais de glicemia intermediários entre o primeiro e segundo experimento se observado as 08 horas de estresse. O mesmo comportamento é observado para o lactato.

Tabela 26. Elevação em porcentagem (%) dos níveis de glicose e lactato no sangue (na primeira hora de análise) em relação aos valores basais para cada experimento de aclimação.

	Glicose		
	NOAC	AC30	AC60/SIMU
1º experimento padrão (carro)	108%	111%	167%
2º experimento grupo estéril (carro)	248%	259%	284%
2º experimento grupo infectado (carro)	303%	303%	308%
3º experimento – 04h (simulador)*	114%	113%	120%
3º experimento – 08h (simulador)*	173%	181%	216%
	AQ	BQ	AF
4º experimento (Simulador)**	150%	125%	250%
	Lactato		
	NOAC	AC30	AC60/SIMU
1º experimento padrão (carro)	180%	173%	328%
2º experimento grupo estéril (carro)	117%	106%	100%
2º experimento grupo infectado (carro)	264%	279%	416%
3º experimento – 04h (simulador)*	103%	116%	242%
3º experimento – 08h (simulador)*	117%	260%	458%
	AQ	BQ	AF
4º experimento sal (Simulador)**	120%	56%	127%
4º experimento sem sal (Simulador)**	171%	124%	189%

*neste terceiro experimento o tratamento AC60 é substituído pelo SIMU, **neste quarto experimento o procedimento de aclimação foi padronizado para todos como 30 minutos.

6.5 Experimento 5: Tempo e densidade ideal de quarentena

No primeiro dia de quarentena houve elevações dos valores glicêmicos em todos os tratamentos mostrando interação entre a densidade de estocagem e o tempo de permanência, sendo que os maiores valores de glicose foram observados no primeiro dia da quarentena para a maior densidade de estocagem (tabela 27). Apesar das alterações iniciais, no 15º dia nos tanques de baixa e alta densidade, observou-se retorno da glicemia ao valor basal. Assim como os efeitos da densidade mais elevada, a presença do patógeno também promoveu os maiores valores glicêmicos em todos os tempos (Tabela 27)

Tabela 27. Glicose (mg/dL) sanguínea do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena de 45 dias com diferentes densidades e tipos de tanque.

	Densidade		Tanques	
	Baixa Dens.	Alta Dens.	Estéril	Contaminado
Basal	51,39±6,15		51,39±6,15	
01d	142.18±40,57Ab	169.80±30,21Aa	78,94±42,95b	100,45±61,06a
15d	56.93±13,82Ba	64.12±20,85Ba		
45d	54.17±18,71Ba	50.52±11,37Ba		
Retorno	15d	15d	NO>	NO>

p-valor	p>0.05	p>0.05	p<0.05	p<0.05
---------	--------	--------	--------	--------

; NO> - valores acima do basal ao final dos 45 dias; NO< - valores abaixo do basal ao final dos 45 dias.

O cortisol sanguíneo foi significativamente maior nas maiores densidades, bem como no grupo de peixes alocados em tanques contaminados. Ao final dos 45 dias de quarentena, nenhum dos animais demonstrou retorno ao valor basal de cortisol antes do estresse por transporte (tabela 28).

Tabela 28. Cortisol ($\mu\text{g/dL}$) sanguíneo do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena de 45 dias com diferentes densidades e presença de patógenos

	Densidade		Tanques	
	Baixa Dens.	Alta Dens.	Estéril	Contaminado
<i>Basal</i>	<i>21,05$\pm$4,08</i>		<i>21,05$\pm$4,08</i>	
01d	80.05 $\pm$ 28,36b	90.08 $\pm$ 22,82a	61.26 $\pm$ 9,76b	100.59 $\pm$ 10,13a
15d	87.46 $\pm$ 8,71a	82.02 $\pm$ 24,81a		
45d	73.53 $\pm$ 11,62a	70.46 $\pm$ 21,66a		
Retorno	NO(>)	NO(>)	NO(>)	NO(>)
p-valor	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

; NO> - valores acima do basal ao final dos 45 dias; NO< - valores abaixo do basal ao final dos 45 dias.

Assim como o parâmetro de glicemia, os níveis de lactato sanguíneo foram maiores nos animais nos tanques contaminados (Figura 9), esse parâmetro aumentou no decorrer do tempo em todos os tratamentos. No entanto, entre as densidades, não foi observada diferença estatística ao longo dos 45 dias

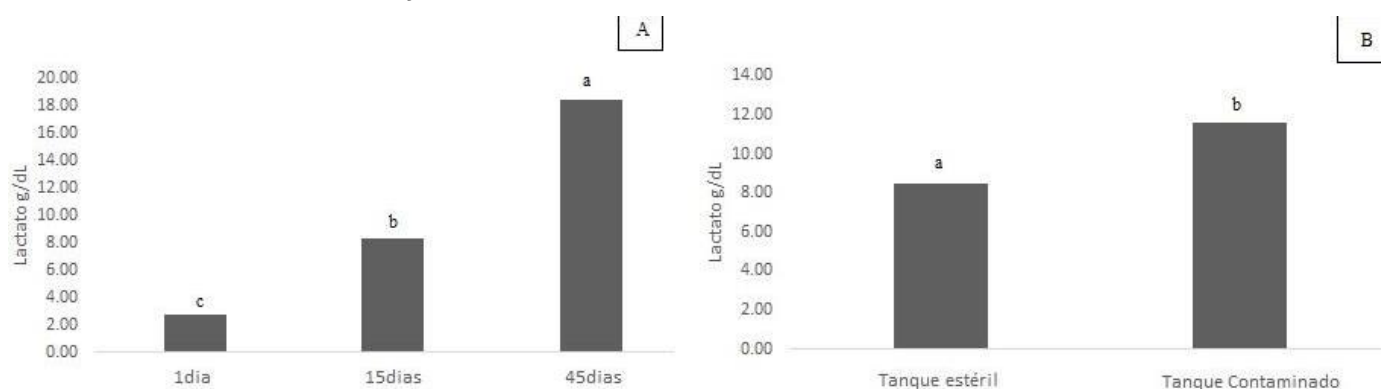


Figura 9. Lactato sanguíneo do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena ao longo de 45 dias (A) em diferentes tipos de tanque (B). Diferentes letras entre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p<0.05$) para comparação de médias. Contaminado- tanques previamente contaminados com bactéria *Aeromonas hydrophila* (10^9 UFC/mL) e fungo *Saprolegnia parasitica* (10^3 zoósporo/mL)

Os níveis de proteína plasmática, diferente da glicemia e lactato demonstraram redução em relação ao valor basal (tabela 29), mas com 15 dias de quarentena, esses valores já haviam retornado ao valor basal nos animais alocados em tanques estéreis. Resultado diferente foi observado para os peixes alocados em tanques contaminados, que além da redução inicial, não houve retorno dos valores basais ao final de 45 dias (tabela 29). Ressalta-se ainda que no grupo contaminado, a alta densidade promoveu em 15 dias o menor valor de proteína plasmática (2,92) comparado a baixa densidade de estocagem.

Tabela 29. Proteína plasmática total (g/dL) no sangue do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena com diferentes densidades e tipos de tanque.

	Estéril		Contaminado	
	Baixa Dens.	Alta Dens.	Baixa Dens.	Alta Dens.
Basal	4,27±0,10	4,27±0,10	4,27±0,10	4,27±0,10
1	3.87±0,21BaX	3.83±0,20BaX	3.88±0,22AaX	3.87±0,17AaX
15	4.35±0,36AaX	4.44±0,28AaX	3.81±0,50AaY	2.92±0,25CbY
45	4.13±0,26AaX	4.22±0,21AaX	3.60±0,42AaY	3.27±0,32BaY
Retorno	15d	15d	NO<	NO<
p-valor	p>0.05	p>0.05	p<0.05	p<0.05

Valores médios expressos em g/dL, diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas e as letras XY entre os tratamentos nos diferentes grupos, indicam diferença estatística pelo teste Tukey (p<0.05), 15d- 15 dias, Baixa Dens.- baixa densidade, Alta Dens.- alta densidade, Contaminado- tanques previamente contaminados com bactéria *Aeromonas hydrophila* e fungo *Saprolegnia parasitica*

A quantidade de células vermelhas também foi afetada pela presença de patógenos na quarentena. Em especial, nos peixes dos tanques contaminados e mantidos em alta densidade, a concentração de hemoglobina se manteve alta durante todo o tempo de permanência na quarentena (45 dias) (tabela 30). Esse valor elevado durante todo ensaio corrobora com a diferença significativa no percentual de hematócrito entre o grupo contaminado e estéril (Figura 10).

Tabela 30. Células vermelhas no sangue do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena com diferentes densidades e tipos de tanque.

	Estéril		Contaminado	
	Baixa Dens.	Alta Dens.	Baixa Dens.	Alta Dens.
Eritrócito (cel/μL x 10 ⁶)				

Basal	0,74±0,14	0,74±0,14	0,74±0,14	0,74±0,14
1	1.31±0,30AaX	1.26±0,20AaX	1.51±0,20AaX	1.55±0,19AaY
15	1.06±0,31ABaX	1.39±0,17AaX	1.36±0,22ABaX	1.56±0,21AaX
45	0.92±0,28BbX	1.25±0,15AaX	1.22±0,22BaX	1.42±0,23AaX
Retorno	45d	NO>	NO>	NO>
p-valor	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Hemoglobina (%)				
Basal	7,66±0,20	7,66±0,20	7,66±0,20	7,66±0,20
1	10.71±2,08AaX	12.67±1,33AaX	12.23±2,96AaX	13.34±1,91AaX
15	7.62±1,80BaX	8.82±1,32BaX	9.39±3,03BaX	11.49±1,93ABaY
45	7.81±1,77BaX	8.04±1,20BaX	8.21±1,50BbX	10.71±1,52BaY
Retorno	15d	15d	15d	NO>
p-valor	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05

Diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas e as letras XY entre os tratamentos nos diferentes grupos, indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p<0,05$), 15d- 15 dias, Baixa Dens.- baixa densidade, Alta Dens.- alta densidade, Contaminado- tanques previamente contaminados com bactéria *Aeromonas hydrophila* e fungo *Saprolegnia parasitica*

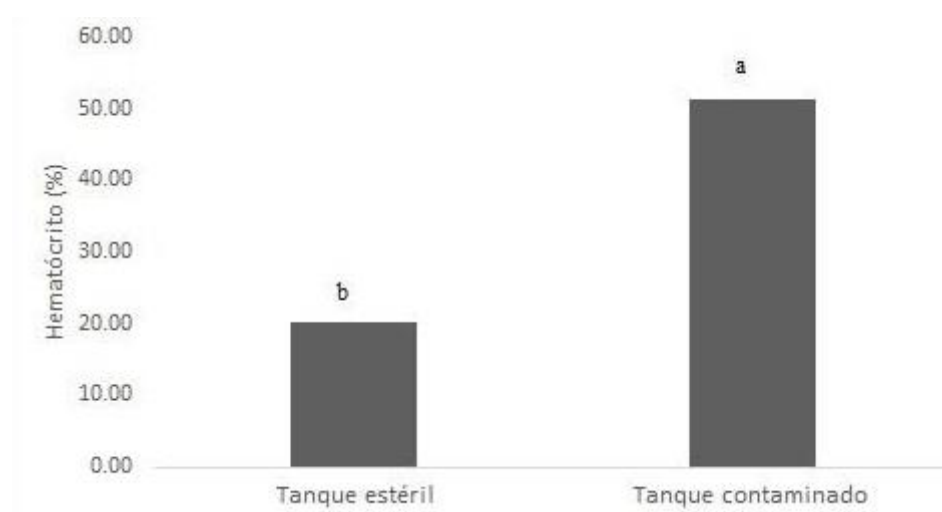


Figura 10. Percentual de hematócrito do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena ao longo de 45 dias (A) em diferentes tipos de tanque (B). Diferentes letras entre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p<0,05$) para comparação de médias. Contaminado- tanques previamente contaminados com bactéria *Aeromonas hydrophila* (10^9 UFC/mL) e fungo *Saprolegnia parasitica* (10^3 zoósporo/mL).

Para os índices hematimétricos ao final dos 45 dias de quarentena, o HCM e CHCM também se mostram elevados e apenas o HCM retorna à normalidade. Resultado diferente no grupo estéril, em que esses índices retornam ao valor basal com 15 e 45 dias (baixa e alta densidade respectivamente) (tabela 31).

Tabela 31. Índices hematimétricos do sangue do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena com diferentes densidades e tipos de tanque.

	Estéril		Contaminado	
	Baixa Dens.	Alta Dens.	Baixa Dens.	Alta Dens.
	CHCM (pg)			
Basal	24,95±0,82	24,95±0,82	24,95±0,82	24,95±0,82
1d	33.04±5,03AaX	39.99±4,94AaX	37.44±8,03AaX	40.63±8,98AaX
15d	24.84±4,86BaX	29.21±4,64BaX	28.28±8,29BaX	34.58±8,50BaY
45d	26.44±6,11BaX	26.41±2,77BaX	25.72±6,68BbX	33.66±8,17BaY
Retorno	15d	45d	45d	NO>
p-valor	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05
	HCM (%)			
Basal	107,05±17,78	107,05±17,78	107,05±17,78	107,05±17,78
1d	85.61±25,74BbX	103.15±21,88AaX	82.00±20,72AaX	87.37±17,45AaY
15d	79.13±33,25BaX	64.42±12,73BaX	68.82±19,92AaX	74.83±17,12AaX
45d	94.25±39,25AaX	65.03±12,22BbX	67.71±21,17AaY	76.19±10,77AaX
Retorno	15d	NO<	NO<	NO<
p-valor	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Valores médios expressos em %, diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas e as letras XY entre os tratamentos nos diferentes grupos, indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p<0.05$), 15d- 15 dias, Baixa Dens.- baixa densidade, Alta Dens.- alta densidade, Contaminado- tanques previamente contaminados com bactéria *Aeromonas hydrophila* e fungo *Saprolegnia parasitica*, CHCM- concentração de hemoglobina corpuscular média e HCM- hemoglobina corpuscular média

Com relação às células de defesa, os trombócitos e linfócitos apresentaram redução inicial no primeiro dia de análise sanguínea independente do tratamento avaliado, o contrário foi observado para monócitos e neutrófilos. Em relação aos basófilos houve aumento dessa célula no primeiro dia de quarentena no grupo de peixes na menor densidade de estocagem e no ambiente não contaminado (tabela 32).

No decorrer do tempo os trombócitos nos peixes no ambiente contaminado na menor densidade apresentaram os menores valores (0,19, Tabela 32) comparados aos peixes na menor densidade nos tanques estéreis. Já para os linfócitos observou-se, após a linfocitopenia inicial no primeiro dia, um aumento gradual ao longo do tempo nos

peixes no ambiente estéril e o inverso no ambiente contaminado. Com relação aos monócitos destaca-se o tratamento dos peixes mantidos em ambiente estéril e na menor densidade onde observou-se retorno aos valores basais aos 45 dias. Neutrofilia foi observada em todos os tratamentos durante todo o período de quarentena, mas com retorno aos valores basais somente nos peixes na menor densidade e no ambiente estéril. Ressalta-se também o retorno aos valores basais dos basófilos e Lg-PAS nos peixes na menor densidade em ambiente estéril (Tabela 32)

Tabela 32. Leucócitos do sangue do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena com diferentes densidades e tanques contaminados ou não.

	Estéril		Contaminado	
	Baixa Dens.	Alta Dens.	Baixa Dens.	Alta Dens.
Trombócitos				
<i>Basal</i>	<i>1,67±0,41</i>	<i>1,67±0,41</i>	<i>1,67±0,41</i>	<i>1,67±0,41</i>
1	0,37±0,09CbX	0,99±0,26AaX	1,13±0,31AaY	1,30±0,31AaX
15	0,53±0,14BbX	0,94±0,25AaX	0,55±0,17BbX	1,19±0,17AaX
45	0,89±0,27AaX	0,92±0,15AaX	0,19±0,06CbY	0,49±0,09BaY
Retorno	NO(<)	NO(<)	NO(<)	NO(<)
p-valor	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Linfócitos				
<i>Basal</i>	<i>8,35±1,25</i>	<i>8,35±1,25</i>	<i>8,35±1,25</i>	<i>8,35±1,25</i>
1	1,06±0,43CbX	2,19±0,83AaX	1,94±0,97AbX	3,13±0,26AaX
15	2,91±0,95BaX	2,81±0,56AaX	1,32±0,24ABaY	1,87±0,73BaY
45	3,03±1,36AaX	2,48±0,67AaX	1,08±0,20BaY	1,78±0,20BaX
Retorno	NO(<)	NO(<)	NO(<)	NO(<)
p-valor	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Monócitos				
<i>Basal</i>	<i>0,84±0,36</i>	<i>0,84±0,36</i>	<i>0,84±0,36</i>	<i>0,84±0,36</i>
1	2,06±0,68AaX	2,10±1,24AaX	2,49±0,97AaX	1,92±0,55AaX
15	1,49±0,46ABaX	1,51±0,25AaX	2,29±0,40AaY	1,64±0,44AaX
45	0,95±0,26BbY	1,79±0,22AaX	3,17±0,51AaY	2,17±0,42AbX
Retorno	45d	NO(>)	NO(>)	NO(>)
p-valor	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Neutrófilo				
<i>Basal</i>	<i>2,41±1,06</i>	<i>2,41±1,06</i>	<i>2,41±1,06</i>	<i>2,41±1,06</i>
1	6,73±1,07AbX	8,44±1,64AaX	9,86±1,28AaY	9,92±1,82AaY

15	4,92±1,24BbX	8,99±0,09AaX	7,60±1,07BbY	10,78±1,46AaY
45	3,78±1,30BbX	8,04±0,92AaX	5,28±0,70CbY	8,42±1,62BaX
Retorno	45d	NO(>)	NO(>)	NO(>)
p-valor	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Basófilo				
<i>Basal</i>	0,33±0,39	0,33±0,39	0,33±0,39	0,33±0,39
1	1,84±0,66AaX	0,26±0,12BbX	0,25±0,25BaY	0,44±0,18BaX
15	0,05±0,02BbX	0,79±0,26AaX	1,50±0,28AaY	1,44±0,30AaY
45	0,31±0,22BaX	0,59±0,10AaX	1,97±0,57AaY	2,07±0,60AaY
Retorno	15d	15d	NO(>)	NO(>)
p-valor	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
LG-PAS				
<i>Basal</i>	0,16±0,14	0,16±0,14	0,16±0,14	0,16±0,14
1	0,66±0,02AaX	0,12±0,03AbX	0,25±0,03BaY	0,18±0,06BaX
15	0,02±0,04BbX	0,26±0,03AaX	0,28±0,03BaY	0,30±0,01BaX
45	0,22±0,05BaX	0,10±0,01AbX	0,57±0,01AaY	0,60±0,01AaY
Retorno	15d	15d	NO(>)	NO(>)
p-valor	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Diferentes letras maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas e as letras XY entre os tratamentos nos diferentes grupos, indicam diferença estatística pelo teste Tukey (p<0.05), 15d- 15 dias, Baixa Dens.- baixa densidade, Alta Dens.- alta densidade, Contaminado- tanques previamente contaminados com bactéria *Aeromonas hydrophila* e fungo *Saprolegnia parasitica*, todos os leucócitos da tabela foram expressos em células/uL x 10⁴

Além das alterações mais acentuadas sem retorno aos valores basais, os peixes dos tanques contaminados e mantidos em alta densidade demonstraram sinais clínicos de bacteriose a partir do 34º dia de quarentena, com mortalidade acumulada de aproximadamente 9%, mas não foram observados sinais clínicos de infecção fúngica. No entanto, houveram sinais de bacteriose como necrose das nadadeiras, necrose muscular, ascite, e acúmulo de líquido intersticial no intestino e de sangue na cavidade celomática (figura 11 e 12).

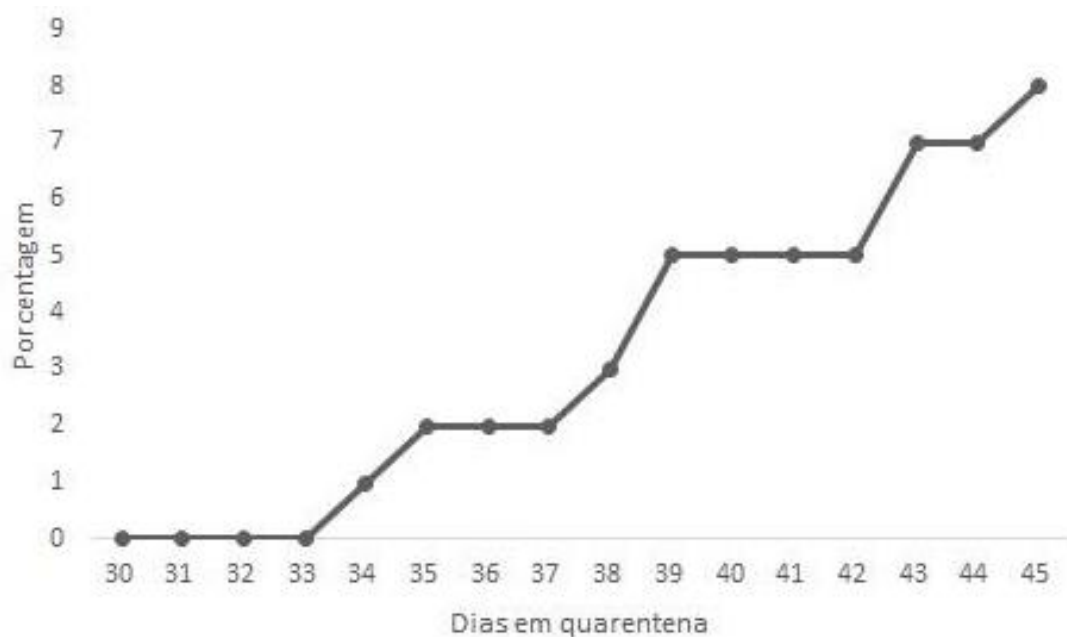


Figura 11. Mortalidade acumulada do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena ao longo de 45 dias em tanques previamente contaminados com bactéria *Aeromonas hydrophila* (10^9 UFC/mL) e fungo *Saprolegnia parasitica* (10^3 zoósporo/100L) com densidade de estocagem de 2g/L.

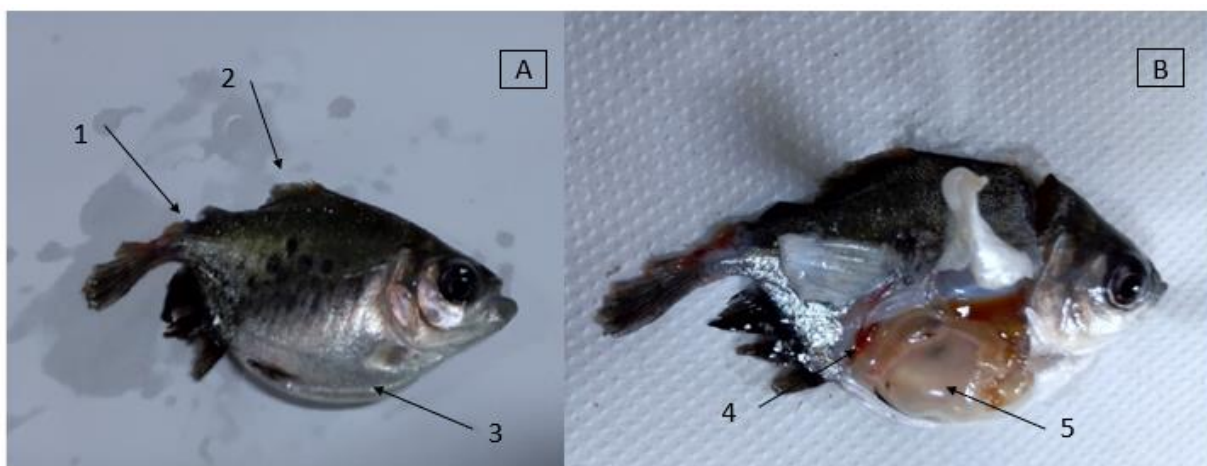


Figura 12. Sinais clínicos do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena ao longo de 45 dias em tanques previamente contaminados com bactéria *Aeromonas hydrophila* (10^9 UFC/mL) e fungo *Saprolegnia parasitica* (10^3 zoósporo/100L). (1) Necrose das nadadeiras, (2) necrose muscular, (3) Ascite, (4) acúmulo de sangue na cavidade celomática, (5) acúmulo de líquido no trato intestinal.

Como resumo desse experimento observou-se que a alta densidade e a presença do patógeno promoveram alterações hematológicas significativas desde o início da quarentena culminando em sinais clínicos e mortalidades observáveis em 34 dias de experimento.

6.6 Experimento 6: Medidas mitigadoras da presença do patógeno na quarentena

Houve elevação dos valores de glicose na primeira hora de análise, no entanto apesar dessa alteração inicial, esse parâmetro bioquímico não diferiu entre os diferentes modelos de quarentena. O uso do sal e nanocompósito foram os únicos tratamentos que promoveram retorno aos valores basais de glicose sanguínea até o final do experimento (tabela 33). Em relação a proteína plasmática, o comportamento foi oposto, reduzindo no início da quarentena (1º dia), mas retornando (elevando) aos valores antes do estresse (tabela 34).

Tabela 33. Glicose (mg/dL) no sangue do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena com diferentes medidas mitigadoras.

	Sl	Fr	Nd	Np	Ctrl-
Basal	43,65±7,29	43,65±7,29	43,65±7,29	43,65±7,29	43,65±7,29
1d	103,38±28,10Aa	105,65±54,0Aa	103,41±35,71Aa	106,49±25,17Aa	130,49±8,42Aa
15d	43,33±8,65Bb	73,17±18,07Aa	54,43±11,97Bab	59,03±16,37Bab	63,97±21,42Ba
45d	42,01±16,42Ba	28,17±3,85Cc	29,46±5,42Cbc	51,46±13,46Ba	35,47±3,55Cb
Retorno	15d	NO(<)	NO(<)	15d	NO(<)
p-valor	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05

(Sl)- sal, (Fr)- formol, (Nd)- nenhum produto incluído na quarentena, (Np)- síntese verde de nanopartículas de cobre, (Ctrl)- controle negativo com animais não aclimatados alocados em quarentenas sem nenhum produto incluído, diferentes letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey (p<0,05), NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Tabela 34. Proteína plasmática no sangue do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena com diferentes medidas mitigadoras.

	Sl	Fr	Nd	Np	Ctrl-
Basal	5,20±0,20	5,20±0,20	5,20±0,20	5,20±0,20	5,20±0,20
1d	3.75±0,36Ba	3.78±0,29Ca	3.42±0,47Ca	3.33±0,23Ba	3.75±0,34Ca
15d	4.66±0,30Aa	4.72±0,23Ba	4.35±0,56Ba	4.26±0,26Aa	4.68±0,39Ba
45d	4.78±1,67Aa	5.36±0,27Aa	5.00±0,54Aa	4.91±0,13Aa	5.33±0,32Aa
Retorno	45d	45d	45d	45d	45d
p-valor	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

(Sl)- sal, (Fr)- formol, (Nd)- nenhum produto incluído na quarentena, (Np)- síntese verde de nanopartículas de cobre, (Ctrl)- controle negativo com animais não aclimatados alocados em quarentenas sem nenhum produto incluído, diferentes letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$), NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Para células vermelhas bem como índices hematimétricos, não houve diferença entre os modelos de quarentena. No entanto, todos esses parâmetros variaram ao passar do tempo, com elevação na quantidade de eritrócitos e redução nas concentrações de hemoglobina e hematócrito. Para os índices hematimétricos, o comportamento dos parâmetros foi similar, no entanto com expressiva diferença para o tratamento ND (nenhum produto inserido nos tanques de quarentena). Este tratamento demonstrou as maiores alterações aos 15 dias (tabela 35).

Tabela 35. Valores eritrocitários no sangue do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena com diferentes medidas mitigadoras.

	Sl	Fr	Nd	Np	Ctrl-
Eritrócitos (cel/ μ L x 10^6)					
Basal	0,97 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,07
1d	1.70 $\pm$ 0,24	1.71 $\pm$ 0,22	1.74 $\pm$ 0,52	1.62 $\pm$ 0,24	1.90 $\pm$ 0,12
15d	0.96 $\pm$ 0,18	0.97 $\pm$ 0,24	1.00 $\pm$ 0,54	0.88 $\pm$ 0,18	1.16 $\pm$ 0,13
45d	1.16 $\pm$ 0,16	1.16 $\pm$ 0,20	1.19 $\pm$ 0,52	1.08 $\pm$ 0,15	1.36 $\pm$ 0,16
Retorno	15d	15d	15d	15d	15d
p-valor	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Hemoglobina (g/dL)					
Basal	7,63 $\pm$ 1,07	7,63 $\pm$ 1,07	7,63 $\pm$ 1,07	7,63 $\pm$ 1,07	7,63 $\pm$ 1,07
1d	9.19 $\pm$ 2,94	9.90 $\pm$ 2,75	11.77 $\pm$ 2,46	10.17 $\pm$ 1,85	10.19 $\pm$ 1,78
15d	6.17 $\pm$ 2,96	6.87 $\pm$ 2,77	8.74 $\pm$ 2,47	7.15 $\pm$ 1,85	7.17 $\pm$ 1,90
45d	7.33 $\pm$ 2,94	8.03 $\pm$ 2,80	9.90 $\pm$ 2,80	8.31 $\pm$ 1,67	8.32 $\pm$ 1,82
Retorno	15d	15d	NO(>)	15d	15d
p-valor	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Hematócrito (%)					
Basal	22,11 $\pm$ 1,72	22,11 $\pm$ 1,72	22,11 $\pm$ 1,72	22,11 $\pm$ 1,72	22,11 $\pm$ 1,72
1d	25.31 $\pm$ 1,29	27.20 $\pm$ 1,14	25.86 $\pm$ 4,08	25.42 $\pm$ 1,33	26.64 $\pm$ 2,28
15d	22.16 $\pm$ 1,42	24.05 $\pm$ 0,96	22.72 $\pm$ 4,02	22.27 $\pm$ 1,55	23.50 $\pm$ 2,24
45d	23.44 $\pm$ 1,42	25.33 $\pm$ 1,24	24,00 $\pm$ 3,88	23.55 $\pm$ 1,49	24.77 $\pm$ 2,14
Retorno	15d	NO(>)	15d	15d	15d
p-valor	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

(Sl)- sal, (Fr)- formol, (Nd)- nenhum produto incluído na quarentena, (Np)- síntese verde de nanopartículas de cobre, (Ctrl)- controle negativo com animais não aclimatados alocados em quarentenas sem nenhum produto incluído,

diferentes letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$), NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Tabela 36. Índices hematimétricos no sangue do tambaqui *C. macropomum* submetido a quarentena com diferentes medidas mitigadoras.

	Sl	Fr	Nd	Np	Ctrl-
VCM (fL)					
Basal	220,29±13,81	220,29±13,81	220,29±13,81	220,29±13,81	220,29±13,81
1d	151.73±24,98	161.47±19,49	166.61±72,63	160.10±26,48	140.63±16,56
15d	238.33±51,03	260.64±53,71	477.62±71,92	261.70±53,56	204.96±34,24
45d	205.86±30,79	223.72±39,46	243.80±13,85	221.43±29,33	185.00±29,49
Retorno	15d	45d	45d	15d	15d
p-valor	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
HCM (pg)					
Basal	82,57±8,72	82,57±8,72	82,57±8,72	82,57±8,72	82,57±8,72
1d	54.35±17,14	59.29±19,13	73.23±25,59	65.36±19,38	53.93±11,37
15d	65.05±32,45	78.52±42,04	143.65±15,73	87.07±34,84	62.52±18,70
45d	64.07±26,97	72.26±29,91	93.36±33,29	79.45±22,73	62.80±18,41
Retorno	NO(<)	15d	45d	15d	NO(<)
p-valor	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05
CHCM (%)					
Basal	37,70±5,15	37,70±5,15	37,70±5,15	37,70±5,15	37,70±5,15
1d	36.69±12,86	36.58±10,72	45.92±8,36	40.29±8,43	38.34±6,52
15d	28.44±14,69	28.72±11,93	38.83±9,75	32.56±9,70	30.65±8,29
45d	31.66±13,69	31.88±11,63	41.67±9,08	35.61±8,39	33.67±7,27
Retorno	1d	1d	15d	15d	1d
p-valor	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

(Sl)- sal, (Fr)- formol, (Nd)- nenhum produto incluído na quarentena, (Np)- Nanocompósito de cobre e prata, (Ctrl)- controle negativo com animais não aclimatados alocados em quarentenas sem nenhum produto incluído, diferentes letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$), NO> - valores acima do basal ao final das 96 horas; NO< - valores abaixo do basal ao final das 96 horas

Relativizando os valores de glicose, observa-se que existiu uma diferença de intensidade de estresse de transporte entre o primeiro e o segundo experimento de quarentena sendo que no segundo experimento houve aumento próximo de 130-140% em relação ao valor basal, já no primeiro experimento esse aumento alcançou valores entre 178% a 230% em relação ao basal, com destaque para o aumento acentuado da glicose nos peixes da alta densidade no EXP 5.

Tabela 37. Elevação em porcentagem (%) dos níveis de glicose (na primeira hora de análise) em relação aos valores basais para cada experimento de quarentena.

5º EXP – Tempo e densidade ideal de quarentena	Glicose (mg/dL)				
	BAIXA DENS.		ALTA DENS.		
	178%		231%		
	Sl	Fr	Nd	Np	Ctrl-
6º EXP – Medidas mitigadoras na presença de patógeno na quarentena	139%	144%	139%	146%	202%

(Sl)- sal, (Fr)- formol, (Nd)- nenhum produto incluído na quarentena, (Np)- Nanocompósito de cobre e prata, (Ctrl)- controle negativo com animais não aclimatados alocados em quarentenas sem nenhum produto incluído

7. DISCUSSÃO

O transporte de peixes é um dos procedimentos mais estressantes na aquicultura e a adaptação dos peixes a uma nova condição de cativeiro é primordial para o sucesso da criação, dessa forma os procedimentos de aclimação e quarentena são medidas importantes para mitigar esse estresse de forma a garantir a sustentabilidade da piscicultura reduzindo disseminação de doenças e mortalidades. A presença de patógenos na água e a aclimação inadequada são fatores relevantes na adaptação dos animais aos novos ambientes de criação. Um procedimento de aclimação adequado (aclimação rápida em 30 min) ajudou a mitigar os efeitos negativos causados pelo estresse do transporte e pela presença de patógenos.

A presença de patógenos no novo ambiente de criação requer um procedimento de aclimação, no entanto, um procedimento inadequado, como demonstrado no presente estudo (aclimação em 60min – AC60), reduz a resistência dos peixes e aumenta o aparecimento de sinais clínicos e mortalidade. A aclimação em 60 minutos causou mais alterações bioquímicas do que a aclimação em 30 minutos apontando o “tempo de manipulação” como um possível estressor adicional. Santos *et al.* (2020) submeteram tambaquis ao estresse por transporte (durante 8 horas) e observaram alterações bioquímicas, como aumento nos valores de glicose e cortisol, que retornaram aos valores basais apenas em 96 h após o transporte. No presente estudo, usando a mesma espécie de peixe em transporte semelhante (também por 8 horas), o procedimento de aclimação rápida (AC30) promoveu o retorno dos parâmetros bioquímicos em 24 h. Essa diferença corrobora a hipótese de que o manejo de aclimação e o tempo aplicado são estressores e devem ser considerados durante o manejo pós-transporte.

A equalização dos parâmetros de qualidade da água nos procedimentos de aclimação é um fator importante, pois diferentes parâmetros de qualidade da água nos

tanques originais e receptores podem causar alterações fisiológicas e se tornam estressores adicionais. Alterações no pH (elevação ou redução) podem promover esses desequilíbrios fisiológicos nos animais (HAN *et al.*, 2018; DUAN *et al.*, 2019). Este parâmetro, comumente expresso em valores logarítmicos, quando alterado abruptamente (± 1 ponto) em um curto espaço de tempo, afeta diretamente o metabolismo (TUNDISI, 2016). No entanto, alterações em temperatura ocorridas de forma abrupta (assim como demonstrado no presente estudo) também podem promover estresse e alterações fisiológicas afetando diretamente o metabolismo dos animais, tanto quanto as variações em pH. No presente estudo, curiosamente o tambaqui que é naturalmente de água ácida e quente (pH 6,5 e 28°C) apresentou respostas fisiológicas adaptativas mais adequadas quanto aclimatado em água alcalina e quente. Isso pode ser decorrente dos limites de qualidade de água para cada espécie de peixe, sendo que o pH 4,6 utilizado no experimento 3 é muito inferior ao limite de 6,5 encontrado na literatura (HORBE *et al.*, 2013; MORAES *et al.*, 2020) porém o outro valor testado que foi 8,4 é próximo do limite superior de pH para o tambaqui que é de 8, talvez por isso a melhor resposta na aclimação para o ambiente alcalino do que o ácido no presente experimento, mas ressalta-se a importância de respeitar os limites de qualidade de água própria para a espécie.

Apesar de importante, a equalização dos parâmetros hídricos não é o único fator a ser considerado para um manejo adequado durante o procedimento de aclimação. O tempo aplicado a este manejo é importante para a adaptação dos peixes aos novos ambientes e para prevenir surtos de doenças, conforme observado neste trabalho.

Com base nos resultados apresentados, os valores de glicose dobraram em comparação com a linha de base (antes do estresse), semelhante aos achados de Barton (2000), que demonstrou 150% mais glicose do que os valores originais no sangue de truta arco-íris após o estresse de transporte. A mesma resposta foi observada para lactato e cortisol; havendo um aumento desses parâmetros na primeira hora após o estresse (WINBERG *et al.*, 2016). Níveis elevados de glicose garantem mais energia para suportar momentos estressantes (SAMPAIO E FREIRE, 2016; WINBERG *et al.*, 2016). Porém, a persistência de valores elevados de lactato e cortisol podem comprometer a saúde dos peixes, portanto, retorná-los aos valores basais ou próximos deles é importante para garantir a adaptação dos peixes às novas condições. A aclimação inadequada pode comprometer a regulação por feedback negativo desses parâmetros e influenciar a homeostase imune e fisiológica, conforme observado por Odhiambo *et al.* (2020) e Santos *et al.* (2020).

Em condições contaminadas ou estéreis, a aclimação por 30 minutos promoveu retornos aos valores basais para 52% e 76% de todos os parâmetros sanguíneos analisados, respectivamente, em comparação com 33% e 42% para peixes não aclimatados. O pior manejo foi a aclimação por 60 min, quando apenas 9% e 28% dos parâmetros sanguíneos retornaram aos valores basais, demonstrando que apesar das condições adequadas para o transporte, a aclimação inadequada é um fator prejudicial.

A presença de patógenos na água, quando infecta o animal, aumenta a respiração anaeróbica devido ao aumento da demanda de oxigênio, podem causar hemólise e dano celular, e consequentemente imunossupressão (REDDY *et al.*, 2013). Esse efeito foi observado pelo aumento de cortisol, lactato, VCM e uma redução nos neutrófilos; e a presença de sinais clínicos em peixes expostos a água contaminada. No entanto, os peixes aclimatados por 30 min foram mais tolerantes ao estresse e à infecção, conforme observado no presente estudo.

Outro ponto significativo a ser considerado neste estudo foi o desequilíbrio osmótico durante a primeira hora. Quando os peixes sofrem qualquer tipo de estresse, é comum a redução do sódio e potássio plasmáticos (WINBERG *et al.*, 2016). O retorno dos valores normais de Na e K após o transporte é importante para garantir a homeostase osmótica e o tratamento AC30 foi o único procedimento onde os valores retornaram aos valores basais em 96 h.

A imunossupressão é um grande problema em peixes devido a condições estressantes. A redução de algumas células de defesa, como trombócitos, linfócitos e neutrófilos, é uma porta de entrada para patógenos oportunistas, como *A. hydrophila* e *S. parasitica* (FAZIO *et al.*, 2019). Os neutrófilos são a primeira linha de defesa contra microrganismos fagocitários; porém, em peixes, outras células, como os trombócitos, apresentam a mesma capacidade (fagócitos) (RANZANI PAIVA *et al.*, 2013). Embora não haja uma definição específica da real função dos trombócitos no sangue, neste estudo os trombócitos foram uma das células mais importantes relacionadas à infecção causada pelo estresse e foram influenciados positivamente pelo tratamento AC30. Em estudos com inflamação em peixes foi demonstrada a presença de trombócitos no local inflamatório após injeção de flogógenos na vesícula gasosa de pacus (BOZZO *et al.* 2022) e tilápias (MARTINS *et al.* 2008) demonstrando sua diapedese para o foco inflamatório e uma ação fagocíticas contra agentes estranhos.

A soma de todas as alterações no sangue depende da intensidade do estresse, que reflete o processo de aclimação. Portanto, o procedimento de aclimação é relativo e não absoluto. Quanto maior a carga de estresse, mais rápida a aclimação deve ser para evitar problemas futuros. Isso foi observado em animais no

presente trabalho, em animais com maiores índices de estresse (após 8 horas de estresse por transporte), os procedimentos rápidos de aclimação ou não aclimação demonstraram melhor eficácia em mitigar as alterações fisiológicas se comparado ao procedimento lento (60 minutos). Contudo, quando os peixes foram submetidos a uma carga menor de estresse (apenas 4 horas de estresse), o procedimento de aclimação em 30 minutos se mostrou mais benéfico para o metabolismo do animal. Porém mesmo se considerando uma não aclimação devido ao estresse intenso, isso não justifica a inserção dos peixes diretamente no sistema de criação e por isso a importância da quarentena.

Os manejos profiláticos de uma quarentena podem evitar a transmissão de doenças entre tanques, fazendas aquícolas ou mesmo em regiões (BEHRINGER *et al.*, 2020). Sua importância foi observada no presente estudo pois apesar das características oportunistas dos patógenos utilizados, surtos de mortalidade ou quaisquer sinais clínicos não foram observados até os 30 dias de quarentena.

O procedimento de aclimação adequado (aclimatar em 30 minutos com trocas parciais de água) possivelmente mitigou parte do estresse sofrido nos primeiros momentos evitando um quadro de imunossupressão aguda. Apesar das alterações iniciais como elevação de glicose e cortisol, ou redução de algumas células de defesas como linfócitos e trombócitos, nenhuma dessas alterações foi significativamente decisiva para tornar os animais susceptíveis a doenças. Além do mais, todas as alterações sanguíneas advindas de momentos de estresse, tendem a retornar aos seus valores basais dentro de um período agudo (em até 96 horas) (WINBERG *et al.*, 2006). No presente estudo, com 15 dias de quarentena, a maioria dos parâmetros sanguíneos demonstraram o seu retorno à normalidade, principalmente nos animais alocados em tanques livres de agentes patogênicos. No entanto, para os outros peixes com a presença do patógeno na água ao longo de 15 dias demonstrou ser um fator que mantém alguns parâmetros sanguíneos ainda alterados como a proteína plasmática total, sendo isso possivelmente caracterizado como um estresse crônico.

Em condições normais, após situações de estresse, a redução da proteína plasmática total pode ser um reflexo da quebra de algumas proteínas como a albumina para manutenção da homeostasia. Em seguida, sua elevação é uma resposta fisiológica relacionada a produção de imunoglobulinas para uma melhor defesa imunológica e uma tentativa da regulação pressão oncótica que auxilia em processos inflamatórios (SULYA, 1961; KEY, 1993). Essa pressão oncótica, ou osmótica coloidal, é responsável principalmente pela formação de edema e acúmulo de líquido em regiões de inflamação. Esse acúmulo de líquido acentuado foi observado nos animais em quarentena com densidade alta e tanques contaminados, possivelmente um resultado de infecção

crônica da bactéria *Aeromonas hydrophila*. Um dos principais sinais clínicos dessa bactéria está relacionada a problemas gastrointestinais, sendo esse provavelmente o primeiro ponto de inflamação nos peixes em confinamento. Com a possível desregulação da pressão osmótica coloidal, os níveis de proteína plasmática desses animais não retornavam à normalidade devido a infecção e tentativa de auxiliar no processo inflamatório do trato intestinal.

Os demais sinais clínicos como corrosão das nadadeiras e necrose muscular podem estar relacionadas a maior densidade. Com um maior número de peixes dentro do tanque, uma maior quantidade de encontros agonísticos pode ter ocorrido entre os animais, provocando cortes e pequenas lesões na pele que servem de porta de entrada para os patógenos. Somando isso alguns outros fatores como altos níveis de lactato sanguíneo durante alguns dias que podem gerar problemas com estresse oxidativo, bem como uma menor quantidade de células de defesa a exemplo dos neutrófilos e trombócitos, facilita a infecção por patógenos oportunistas. Isso explicaria o surgimento de sinais clínicos ao final do período experimental (com 34 dias de quarentena) e não no início.

Por essa razão, o presente estudo demonstra que a permanência ideal de uma quarentena está diretamente ligada a densidade escolhida, e quanto maior essa densidade maior a necessidade de medidas para mitigar problemas. O uso de sal, comumente reportado na literatura como mitigador de estresse, em um procedimento de quarentena pode não demonstrar efetividade para o controle de microrganismos oportunistas como as bactérias. Alternativas com efeitos antimicrobianos podem auxiliar mais efetivamente a manutenção dos animais dentro dos tanques, mesmo que estes estejam contaminados. Através da aplicação desses produtos com potencial bactericida, as cargas de bactérias patogênicas presentes na água dos tanques podem reduzir e conseqüentemente gerar menos riscos aos animais em confinamento. Contudo, como observado no presente estudo, mesmo em exposição a patógenos e com produtos incluídos nos tanques com objetivo de mitigar problemas por infecções, os manejos de aclimação e quarentena impostos no experimento foram eficientes para igualar os animais que não receberam produtos mitigadores na quarentena com aqueles que receberam, pontuando assim a importância deste manejo.

Contudo, destaca-se que os peixes não aclimatados e submetidos a patógenos no experimento 6 não apresentaram quaisquer sinais clínicos ou mortalidade o que seria contraditório, porém ressalta-se que a intensidade de estresse do segundo experimento de quarentena (EXP 6) teve uma menor alteração dos valores glicêmicos quando comparados ao primeiro experimento de quarentena (EXP 5 tabela 33), inferindo que esses animais sofreram um estresse menos intenso e talvez por isso também não

tenham apresentado sinais clínicos. Além disso, os animais na quarentena foram alimentados, diferente dos animais nos experimentos de aclimação que não receberam alimentação durante 96h. Uma alimentação adequada para a espécie permite que ela possa se adaptar à nova condição e possibilitar o retorno à normalidade do sistema imune. Assim, considerando o quesito alimentação, nota-se os tambaquis submetidos ao estresse de transporte não procuram alimento entre período entre 24-96h pós transporte tornando assim a aclimação um procedimento importante para mitigar esse estresse.

Dessa forma utilizando um manejo adequado de aclimação aliado a uma quarentena executada dentro dos parâmetros já mencionados garantiria maior adaptação dos peixes a nova condição de criação evitando surtos e doenças.

8. CONCLUSÃO

Os peixes devem ser aclimatados em 30 minutos com trocas parciais de água, e mantidos em quarentena na densidade de 1g de peixe por litro em no mínimo 34 dias.

CAPITULO 4
PROTOCOLO DE MANEJO DE ACLIMATAÇÃO E QUARENTENA
PARA ALEVINOS DE TAMBAQUIS



9. PROTOCOLO DE 6 PASSOS (P6P)

O presente documento, com base nos resultados dos experimentos apresentados, demonstra um “*protocolo de 6 passos*” para aclimação e quarentena do peixe amazônico tambaqui *Colossoma macropomum*. O seguimento de todos os passos pode assegurar maior sobrevivência dos animais através de manejo profilático e reduzir as probabilidades de contaminações cruzadas entre tanques, propriedades ou regiões.

Passo 1 – Quando necessário o transporte dos peixes para outro local (outra cidade ou região), é de extrema importância aferir os parâmetros de qualidade de água dos tanques em que os animais são mantidos (tanques de origem). Os principais parâmetros recomendados para registro antes de executar a captura dos peixes e consequentemente o transporte, são **temperatura** (°C) e **pH**. Nesse sentido é imprescindível que se tenha a disposição equipamentos para medir os parâmetros de qualidade de água como oxímetros, pHmetros, termômetros, etc.

Passo 2 – Com base nos valores de temperatura e pH, aferidos anteriormente nos tanques de origem (*passo 1*), os tanques receptores (tanques que receberão os peixes) devem ter temperatura e pH igual ou mais elevada para aclimação (Figura 13).

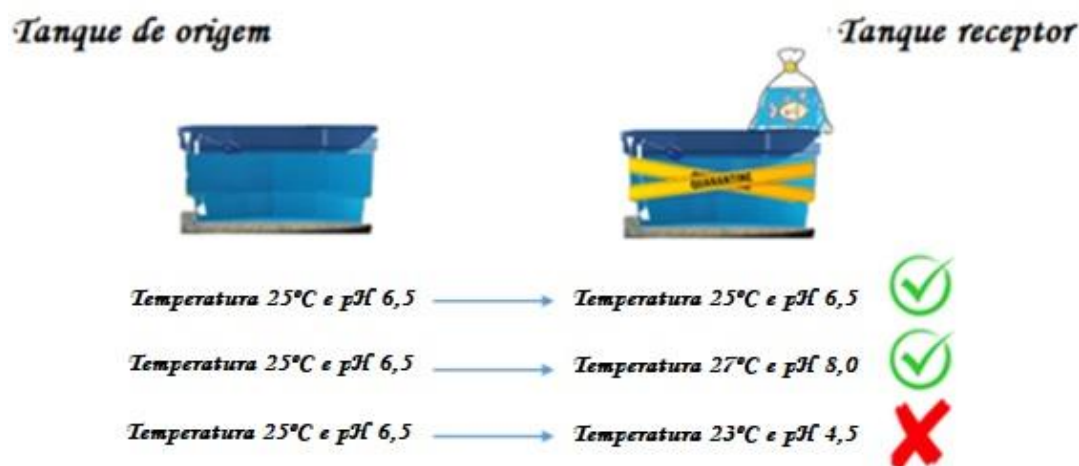


Figura 13. Ajuste de temperatura para os tanques receptores (tanques os quais os peixes serão aclimatados) em relação aos tanques de origem (tanques os quais os animais estavam anteriormente). O protocolo determina uma aclimação em parâmetros iguais ou mais elevados, evitando águas frias e mais ácidas. Aclimações em águas frias e ácidas implica em maior monitoramento quanto a presença de sinais clínicos para tomada das medidas de controle.

Passo 3 – Antes retirar os animais dos tanques de origem e prepará-los para o transporte, alguns peixes devem ser capturados e submetidos a coleta de sangue para determinar os parâmetros de glicemia, cortisol, sódio e lactato (considerados valores basais). Recomenda-se o mínimo de 10 animais para essa coleta inicial, sendo que estes não devem mais ser incluídos no transporte devido o estresse do procedimento. Caso não seja possível a realização de todos esses parâmetros, realize pelo menos a análise de glicose como o procedimento abaixo:

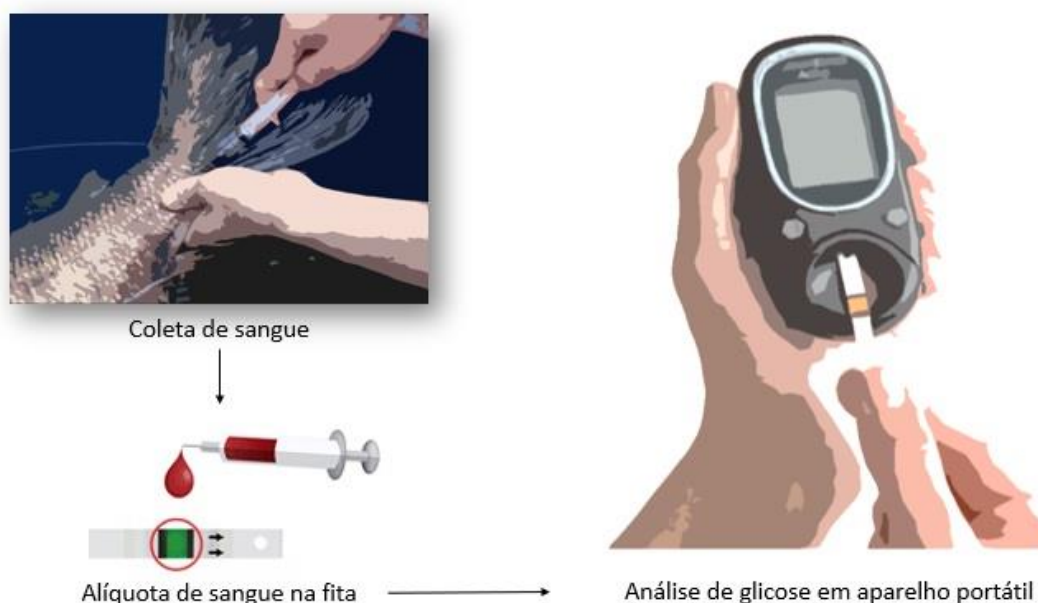


Figura 14. Procedimento de análise sanguínea com aparelho portátil para mensurar glicose (mg/dL); Primeiro passo coleta de sangue em vasos caudais; segundo passo adicionar alíquotas de sangue em fitas; terceiro passo inserir a fita com sangue no aparelho portátil para visualizar o resultado

Embora atualmente análises de sódio, linfócitos cortisol e lactato ainda sejam realizados em laboratórios, existem equipamentos portáteis para tal fim, porém ainda são onerosos. Com possível aumento de demanda futura, com avanço da tecnologia tanto de análise dos parâmetros quanto da tecnificação da piscicultura, o uso de analisadores portáteis poderá ser uma opção viável.

Passo 4 – Após o transporte, no momento de chegada, outros 10 peixes devem ser selecionados para coleta de sangue e analisados os mesmos parâmetros sanguíneos descritos no passo anterior (**passo 3**) para então selecionar a melhor opção abaixo.

Recomendações/execuções

1. Elevações de glicose e cortisol em até 200%, deve-se realizar o procedimento de aclimação com trocas parciais de água por 30 minutos (retirar aproximadamente 6% em volume de água dos sacos de transporte, descartar, e adicionar o mesmo volume em água dos tanques receptores até equalização dos parâmetros de água).
2. Elevações de glicose e cortisol **ACIMA** de 200%, deve-se realizar o procedimento de aclimação com trocas parciais de água em menos de 30 minutos ou liberar imediatamente os peixes nos tanques receptores de quarentena (recomenda-se uma avaliação técnica dos possíveis sinais clínicos dos animais nesse momento para melhor tomada de decisão). Durante esse tempo, os parâmetros de qualidade de água prioritários (temperatura e pH) devem ser equalizados (valores iguais entre o tanque receptor e o saco de transporte dos animais).
3. Se houve redução de sódio no sangue maior que 30% em relação ao valor basal (dos peixes nos tanques de origem), deve-se tomar como prioridade a equalização apenas a temperatura e seguir as recomendações do segundo passo (passo 2) para uma liberação mais rápida dos animais. Os parâmetros semelhantes entre os tanques originais e receptores são importantes quando houver uma alteração no sódio plasmático. Mesmo com uso de sal no transporte, mas numa situação de qualidade de água muito diferente do tanque original, um monitoramento dos peixes é recomendado mesmo com aplicação dos procedimentos corretos de aclimação
4. Se houve elevação de lactato maior que 100% em relação ao valor basal (dos peixes nos tanques de origem), deve-se tomar alguma medida mitigadora para o controle de infecções bacterianas e/ou fúngicas (Observação: Essas medidas mitigadoras podem ser evitadas se o produtor assegurar que os tanques receptores estão livres de patógenos, no caso de aquários ou sistemas de recirculação).
5. Peixes que apresentem valores acima dos mencionados e que apresentem sinais clínicos devem ser reportados ao vendedor para providências. O critério técnico de um profissional capacitado deve avaliar o aceite ou não do lote transportado e a inserção dos peixes na piscicultura.

Passo 5 – Após o procedimento de aclimação, seguindo as orientações dos quatro passos anteriores, os alevinos de tambaquis devem ser mantidos em quarentena com aeração forçada na densidade de estocagem de 1g de peixe por litro.

Passo 6 – Após 15 dias de quarentena, alguns peixes devem ser selecionados para coleta de sangue (de 6 a 9 animais) para avaliação sanitária por técnico especializado principalmente para análise das células de defesa. Se houver elevação de neutrófilos e monócitos acima de 50% em relação do valor basal (peixes do tanque de origem), recomenda-se a aplicação de alguma medida mitigadora para o controle de uma possível infecção bacteriana. Ao final de 34 dias, se não houver a manifestação de nenhum sinal clínico, os animais podem ser liberados para tanques de criação.

Abaixo um fluxograma do protocolo de 6 passos para uma aclimação e quarentena adequada:

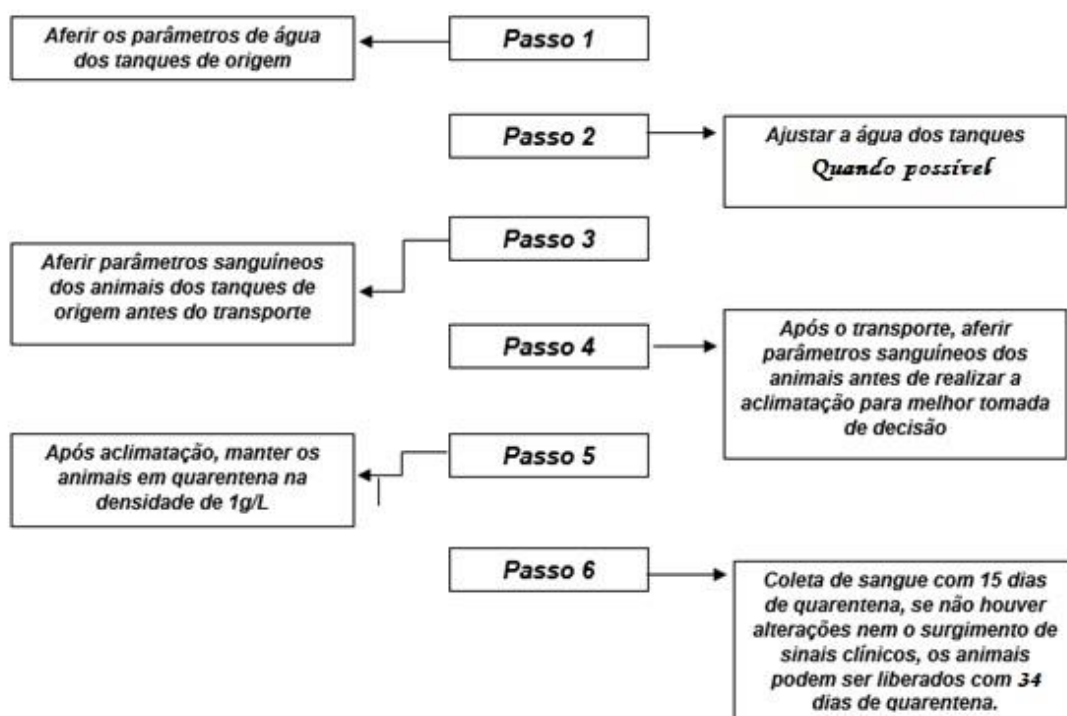


Figura 14. Fluxograma proposto para o protocolo de 6 passo (P6P) para realização dos procedimentos profiláticos de aclimação e quarentena em tambaqui.

Ressalta-se que a estrutura construída para a quarentena deve ser isolada do sistema de criação para evitar contaminações cruzadas. Além disso, todos utensílios utilizados na quarentena não deverão ser compartilhados com outras áreas da criação. Destaca-se também a importância do técnico no acompanhamento de todo o processo, da recepção ao acompanhamento da quarentena.

CAPÍTULO 5

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um protocolo padronizado de aclimação e quarentena para alevinos de tambaquis foi desenvolvido permitindo assim agregá-lo como uma boa prática de manejo na piscicultura. O empirismo tanto nos trabalhos anteriores quanto em ambiente produtivo real referente a aclimação e quarentena pôde ser substituído por um protocolo padronizado. O trabalho é pioneiro em explicar, para uma espécie tropical, a importância da aclimação e quarentena assim como a padronização desses manejos.

O processo de aclimação mostrou-se importante em mitigar o estresse de transporte mesmo quando o transporte é realizado seguindo as recomendações técnicas. Pois uma qualidade de água do tanque receptor muito diferente dos tanques originais obriga à uma aclimação mesmo após um transporte bem realizado.

Algumas perguntas ainda necessitam de estudo futuros para completar o total entendimento sobre aclimação e quarentena, como por exemplo: qual a melhor alternativa para aclimação, equalizar parâmetros de qualidade de água ou por volume de água? Os tempos de aclimação podem ser reduzidos (abaixo de 30 minutos) sem afetar ou estressar os animais? Existe alguma forma mais eficiente de realizar a aclimação sem causar estresse pelo manejo convencional (trocas parciais de água)? Animais com sinais clínicos assim que chegam, devem ser separados em quarentenas diferentes? Ou todos os animais devem entrar na mesma quarentena?

Pelo trabalho foi observado também que quando os peixes passam por intenso estresse de transporte, o manejo *per se* de aclimação mostrou-se um agente estressante. Assim, novas técnicas devem ser desenvolvidas para melhorar essa prática de manejo como talvez o uso de equipamentos mecanizados com objetivo de realizar essa troca de água de maneira mais fluida e contínua. Mas apesar de uma não aclimação dos peixes ser um manejo possível quando os peixes estão muito estressados, isso não deve ser feito diretamente no sistema de criação, mas sim numa quarentena.

O uso da quarentena de no mínimo 34 dias garante a observação de sinais clínicos dos animais quando submetidos a estresse de transporte e aclimação permitindo assim o uso de medidas mitigadoras para evitar a disseminação de doenças para dentro do sistema de criação e para outras pisciculturas. Além disso, reduzindo a introdução de patógenos na criação, evitasse uma possível contaminação futura tanto do peixe comercializado quanto de infecções em humanos no caso de possíveis zoonoses.

Alguns parâmetros sanguíneos se mostraram importantes para elucidar os efeitos da aclimação e da quarentena frente aos diversos desafios propostos. No

futuro, equipamentos portáteis que possam ser utilizados a campo podem ser úteis para aferir a intensidade de estresse e assim permitir a melhor estratégia para aclimação e quarentena. Esses equipamentos portáteis auxiliariam na tecnificação do processo produtivo além de agilizar os processos de diagnóstico de estresse a campo, permitindo ao técnico responsável tomar as medidas necessárias para melhor adaptação dos peixes a nova condição.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINROTIMI, O.A.; UEDEME-NAA, B.; AGOKEI, E.O. Effects Of Acclimation On Haematological Parameters Of *Tilapia guineensis* (Bleeker, 1862). *Sci world j.* 2010; 5: 1-4.
- AL-SAGHEER, A. A.; MAHMOUD, H. K.; REDA, F. M.; MAHGOUB, S. A.; AYYAT, M. S. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquac. nutr.* 2018, 24(3):1006-1014.
- ALYAHYA, S. A.; AMEEN, F.; AL-NIAEEM, K. S.; AL-SA'ADI, B. A.; HADI, S.; MOSTAFA, A. A. Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*. *S. j. bio. sci.* 2018, 25(1): 182-185.
- AMÂNCIO, A. S. (2013). Uso de fitoterápico na alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*) como redutor do estresse pós-transporte.
- AZMAT, H.; JAVED, M.; ABDULLAH, S.; JAVID, A.; HUSSAIN, S. M. Growth responses of major carps reared under chronic stress of chromium. *JAPS, J. An. Plant. Sci.* 2018, 28(2): 604-609.
- BARRONCAS, M. F.; PEREIRA-FILHO, M.; DE CARVALHO GOMES, L.; ROUBACH, R.; ONO, E. A. Efeitos da troca de água sobre os índices zootécnicos e qualidade dos efluentes na criação intensiva do tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros escavados. *Ver. Bra. Eng. Pesc.* 2015, 8(1): 49-71.
- BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North. Amer. J. Aquac.* 2000, 62(1): 12-18.
- BASSANI, L.; HASSEMER, M. E. N.; DAMÁSIO, D. L.; LAPOLLI, F. R. Utilização do ozônio na desinfecção de efluentes sanitários 2002. In *XXVIII Congreso Interamericano de Ingenieria Sanitaria y Ambiental*.
- BATISTA-GALLEP, T. B.; PASQUOTO-STIGLIANI, T.; GUILGER, M.; RHEDER, D. T.; GERMANO-COSTA, T.; BILESKY-JOSÉ, N.; LIMA, R. D. effects of commercial nanoparticles of iron oxide (Fe₂O₃): cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress. *Quím. Nov.* 2018, 41: 974-981.
- BAUER, O. N. Spread of parasites and diseases of aquatic organisms by acclimatization: a short review. *Journal of fish biology* 1991, 39(5): 679-686.
- BEHRINGER, D. C.; WOOD, C. L.; KRKOŠEK, M.; BUSHEK, D. Disease in fisheries and aquaculture. *Mar. disease ecol.*, 2020, 183.
- BISWAS, A.; ARAKI, H.; SAKATA, T.; NAKAMORI, T.; TAKII, K. Optimum fish meal replacement by soy protein concentrate from soymilk and phytase supplementation in diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 2019, 506, 51-59.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. D. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazon.* 2006, 36: 349-356.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. D. C.; CHAGAS, E. C.; ARAÚJO, L. D. D. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. *Pesq. Agro. Bras.* 2004, 39: 357-362.
- BRUNO, D. A. *Saprolegnia* and other Oomycetes. *Viral, Bacterial and Fungal Infections* 1999, 599-659.

- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 1997, 83: 575-583.
- CABILLON, N. A. R.; LAZADO, C. C. Mucosal barrier functions of fish under changing environmental conditions. *Fishes* 2019, 4(1): 2.
- CAO, Y.; TVETEN, A. K.; STENE, A. Establishment of a non-invasive method for stress evaluation in farmed salmon based on direct fecal corticoid metabolites measurement. *F. shellfish. immunol* 2017, 66: 317-324.
- CARRASCHI, S. P.; GARLICH, N.; DE SOUZA-POLLO, A.; PEREIRA, D. I. B.; DA CRUZ, C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Isolation of *Saprolegnia aenigmatica* oomycetes and protocol for experimental infection of pacu (*Piaractus esopotamicus*). *Acta Scient. Bio. Sci.* 2018 40: 1-8.
- CARVALHO, E. S.; GOMES, L. C.; BRANDÃO, F. R.; CRESCÊNCIO, R.; CHAGAS, E. C.; ANSELMO, A. A. S. Uso do probiótico Efinol® L durante o transporte de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 2009, 61: 1322-1327.
- CARVALHO, K. Q. D.; PASSIG, F. H.; KREUTZ, C. Tratamento de efluentes 2016.
- CASTRO FREIRE, M. V.; JÚNIOR, R. D. A. S.; COSTA, M. G. A.; FERREIRA, R. L. Transporte de organismos aquáticos: Procedimento fundamental para desenvolvimento da aquicultura. *Pubvet* 2019, 13: 176.
- CHAGAS, E. C.; GOMES, L. D. C.; MARTINS JÚNIOR, H.; ROUBACH, R.; LOURENÇO, J. N. D. P. Desempenho de tambaqui cultivado em tanques-rede, em lago de várzea, sob diferentes taxas de alimentação. *Pesq Agro Bras.* 2005, 4: 833-835.
- DA COSTA SOUSA, N.; DO COUTO, M. V. S.; ABE, H. A.; PAIXÃO, P. E. G.; CORDEIRO, C. A. M.; MONTEIRO LOPES, E.; FUJIMOTO, R. Y. (2019). Effects of an *Enterococcus faecium*-based probiotic on growth performance and health of Pirarucu, *Arapaima gigas*. *Aquac. Res.*, 2019, 50(12), 3720-3728.
- DAIRIKI, J. K.; MAJOLO, C.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; DE OLIVEIRA, M. R.; MORAIS, I. D. S. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. Embrapa Amazônia Ocidental- (INFOTECA-E), 2013.
- DE PAIVA, M. J. T. R.; DE PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. Métodos para análise hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, 2013.
- DEANE, EDDIE E.; WOO, NORMAN YS. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Bioch. biophys. res. communic.* 2005, 330(3): 776-783.
- DEROME, N.; GAUTHIER, J.; BOUTIN, S.; LLEWELLYN, M. Bacterial opportunistic pathogens of fish. The Rasputin effect: When commensals and symbionts become parasitic, 2016, 81-108.
- DO COUTO, M. V. S.; SOUSA, N. C.; ABE, H. A.; CUNHA, F. S.; MENESES, J. O.; PAIXÃO, P. E. G.; FUJIMOTO, R. Y. Dietary supplementation of Probiotic *Enterococcus faecium* improve resistance in *Arapaima gigas* against *Aeromonas hydrophila*. *Aquac. Res.*, 2022, 53(9), 3453-3463.
- DURIGON, E. G.; DE FREITAS SOUZA, C.; BALDISSERA, M. D.; BALDISSEROTTO, B.; ZUFFO, T. I.; PICOLI, F.; DA SILVA, A. S. Biochemical changes in Curimatá

subjected to transport stress and exposed to an agricultural fair. *Comp. Clinic. Pathol.* 2019, 28(3): 761-766.

FAGGIO, C.; FEDELE, G.; ARFUSO, F.; PANZERA, M.; FAZIO, F. Haematological and biochemical response of *Mugil cephalus* after acclimation to captivity. *Cah Biol Mar* 2014, 55(1): 31-36.

FALCON, D. R.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; SOLARTE, W. V. N.; GUIMARÃES, I. Leucograma da tilápia-do-nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidos a estresse por baixa temperatura. *Ciênc. An. Bras.* 2008, 9(3): 543-551.

FAZIO, F. FISH hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. *Aquacultura* 2018, 500: 237-242.

FERREIRA, D. Parâmetros de estresse oxidativo e estudo de lesões histopatológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a agroquímicos. 2010.

FERREIRA, D. Parâmetros de estresse oxidativo e estudo de lesões histopatológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a agroquímicos, 2010.

GOMES, L. C.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C. A.; CHIPPARI-GOMES, A. R.; LOPES, N. P.; URBINATI, E. C. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society* 2003, 34(1): 76-84.

GOMES, L. C.; URBINATI, E. C.; BALDISSEROTTO, B. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, 2005, p. 225-246.

GOMES, L. D. C.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. *Pesquisa agropecuária brasileira* 2003, 38: 283-290.

GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia* 1982, 107-133.

GUY, E. L.; & ALLEN, P. J. Tank Acclimation and Induced Spawning of the Catostomid, Black Buffalo. *North American Journal of Aquaculture* 2018, 80(3): 294-300.

HARMON, T. S. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture* 2009, 1(1): 58-66.

HASSAN, A. M.; EL NAHAS, A. F.; MAHMOUD, S.; BARAKAT, M. E.; AMMAR, A. Y. Thermal stress of ambient temperature modulate expression of stress and immune-related genes and DNA fragmentation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)). *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2017, 15(3): 1343-1354.

HASSAN, A. M.; EL NAHAS, A. F.; MAHMOUD, S.; BARAKAT, M. E.; AMMAR, A. Y. Thermal stress of ambient temperature modulate expression of stress and immune-related genes and DNA fragmentation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)). *Appl Ecol Environ Res*, 2017, 15(3), 1343-1354.

ICES. 2005. **ICES code of practice on the introductions and transfers of marine, organisms 2005.**

- INOUE, L. A. K. A.; BOIJINK, C. L.; RIBEIRO, P. T.; SILVA, A. M. D. D.; AFFONSO, E. G. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. *Acta Amazonica* 2011, 41: 327-332.
- INOUE, L. A. K. A.; BOIJINK, C. L.; RIBEIRO, P. T.; SILVA, A. M. D. D.; AFFONSO, E. G. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. *Acta Amazon.*, 2011, 41, 327-332.
- JATOBÁ, A.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, L. M.; BITENCOURT, M.; RODRIGUES, E.; FACHINI, F. A.; MORAES, A. V. Action time and feed frequency of *Lactobacillus plantarum* for Nile tilapia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 2018, 70(1): 327-332.v.
- JIA, B.; ST-HILAIRE, S.; SINGH, K.; GARDNER, I. A. Biosecurity knowledge, attitudes and practices of farmers culturing yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) in Guangdong and Zhejiang provinces, China. *Aquaculture* 2017, 471: 146-156.
- JONSSON, S.; BRØNNØS, E.; LUNDQVIST, H. Stocking of brown trout, *Salmo trutta* L.: effects of acclimatization. *Fisheries Management and ecology* 1999, 6(6): 459-473.
- KERETZ, K. R.; DINKEN, C. P.; ALLEN, P. J.; SCHRAMM JR, H. L. Survival of pellet-reared, naturalized, and wild advanced-size Largemouth Bass exposed to angling and handling stressors. *North American Journal of Aquaculture* 2018, 80(1): 52-58.
- KEYS, A. The mechanism of adaptation to varying salinity the common eel and the general problem of osmotic regulation in fishes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 1993, 112(776), 184-199.
- KULCZYKOWSKA, E. Z. Stress response system in the fish skin—welfare measures revisited. *Frontiers in physiology* 2019, 10: 72.
- KUNIYOSHI, M. L. G.; DA SILVA-GOMES, R. N.; VIEIRA, J. C. S.; HESSEL, M. C.; MARECO E. A.; CARVALHO, R. F.; DAL-PAI-SILVA, M. Proteomic analysis of the fast-twitch muscle of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after prolonged fasting and compensatory growth. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 2019, 30: 321-332.
- LAHNSTEINER, F.; LAHNSTEINER, E.; KLETZL, M. Differences in metabolism of triploid and diploid *Salmo trutta f. lacustris* under acclimation conditions and after exposure to stress situations. *Aquaculture Research* 2019, 50(9):2444-2459.
- LEIRA, M. H.; DE ASSIS LAGO, A.; BOTELHO, H. A.; MELO, C. C. V.; MENDONÇA, F. G.; DO NASCIMENTO, A. F.; DE FREITAS, R. T. F. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil—Uma revisão. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública* 2016, 3(1): 44-59.
- LEIRA, M. H.; REGHIM, L. S.; DA SILVA CIACCI, L.; DA CUNHA, L. T.; BOTELHO, H. A.; BRAZ, M. S.; MELO, C. C. V. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. *PUBVET* 2017, 11: 538-645.
- LIU, C. H.; WU, K.; CHU, T. W.; WU, T. M. Dietary supplementation of probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth performance and disease resistance against *Vibrio alginolyticus* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquac. Int.* 2018, 26(1): 63-74.
- M. J. T. R., DE PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. Métodos para análise hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, 2013. drugs: special issue for fluoroquinolones—a review. *J. Food Sci.* 78(9), R1321-1333, 2013.

MADUREIRA, T. V.; COSTA, J. L.; MALHÃO, F.; LOPES, C.; GONÇALVES, J. F.; ROCHA, E. Design of a multi-parametric profile for assessing the acclimation period of juvenile brown trout after an acute transport to new housing environment. *Applied An. Behav. Sci.* 2019, 219: 104835.

MAKARAS, T.; STANKEVIČIŪTĖ, M.; ŠIDAGYTĖ-COPILAS, E.; VIRBICKAS, T.; RAZUMIENĖ, J. Acclimation effect on fish behavioural characteristics: determination of appropriate acclimation period for different species. *Journal of Fish Biology* 2021, 99(2): 502-512.

MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M. Y.; MORAES, F. R. D.; GHIRALDELLI, L.; ADAMANTE, W. D. B.; MOURIÑO, J. L. P. (2008). Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. *Ciencia rural*, ISSN 0103-8478, Vol. 38, Nº. 1, 2008, pags. 213-218.

MARTINS, M. L.; SHOEMAKER, C. A.; XU, D.; KLESIUS, P. H. Effect of parasitism on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. *Aquaculture* 2011, 314(1): 18-23.

MENDES, P. P.; ALBUQUERQUE, M. L. L. T.; DE QUEIROZ, D. M.; DA SILVA SANTOS, B. L.; DA COSTA LIMA, A.; DE ANDRADE LOPES, Y. V. Aclimação do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) à água doce com diferentes estratégias de alimentação e calagem. *Acta Scient. An. Sci.* 2006, 28 (1): 89-95.

MENESES, J. O.; DA SILVA, I. C. A.; DA CUNHA, A. F. S.; DOS SANTOS CUNHA, F.; DIAS, J. A. R.; ABE, H. A.; FUJIMOTO, R. Y. Protective effect of *Terminalia catappa* leaf extracts against Saprolegniosis on angelfish eggs. *Aquac. Res.*, 2022, 53(2), 377-387.

NALIATO, R. F.; CARVALHO, P. L. P. F.; VICENTE, I. S. T.; XAVIER, W. D. S.; GUIMARÃES, M. G.; RODRIGUES, E. J. D.; BARROS, M. M. Ginger (*Zingiber officinale*) powder improves growth performance and immune response but shows limited antioxidant capacity for Nile tilapia infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Nutrition* 2021, 27(3): 850-864.

NEVES, M. S.; COUTO, M. V. S.; SOUSA, N. C.; SANTOS, R. F. B.; DIAS, H. M., ABE, H. A.; FUJIMOTO, R. Y. Hematological response of Amazonian ornamental *Peckoltia oligospila* subjected to stress by transportation. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2018, 70(1):13-19.

ODHIAMBO, E.; ANGIENDA, P. O.; OKOTH, P.; ONYANGO, D. Stocking density induced stress on plasma cortisol and whole blood glucose concentration in Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) of lake Victoria, Kenya. *International Journal of Zoology* 2020, p.8.

OH, S. Y.; MARAN, B. V.; PARK, J. W. Optimum feeding frequency for juvenile short barbeled velvetfin *Haplochromis nigripinnis* reared in floating sea cages. *Fisheries Science* 2019, 85(2): 379-385.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: Eduem, 2008.

PEATMAN, E.; MOHAMMED, H.; KIRBY, A.; SHOEMAKER, C. A.; YILDIRIM-AKSOY, M.; BECK, B. H. Mechanisms of pathogen virulence and host susceptibility in virulent *Aeromonas hydrophila* infections of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 2018, 482: 1-8.

PEREIRA-TORRES, D.; GONÇALVES, A. T.; ULLOA, V.; MARTÍNEZ, R.; CARRASCO, H.; OLEA, A. F.; ASTUYA, A. In vitro modulation of *Drimys winteri* bark

- extract and the active compound polygodial on *Salmo salar* immune genes after exposure to *Saprolegnia parasitica*. *Fish & shellfish Immunol.* 2016, 59: 103-108.
- PETERSON, B. C.; CHATAKONDI, N. G.; SMALL, B. C. Ontogeny of the cortisol stress response and glucocorticoid receptor expression during early development in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2019, 231: 119-123.
- RITO, J.; VIEGAS, I.; PARDAL, M. Â.; METÓN, I.; BAANANTE, I. V.; JONES, J. G. Utilization of glycerol for endogenous glucose and glycogen synthesis in seabass (*Dicentrarchus labrax*): A potential mechanism for sparing amino acid catabolism in carnivorous fish. *Aquaculture* 2019, 498:488-495.
- RIZZO BOZZO, F.; DA SILVA CLAUDIANO, G.; YUNIS-AGUINAGA, J.; FERNANDES MARCUSO, P.; RODINI ENGRÁCIA FILHO, J.; RODINI ENGRÁCIA DE MORAES, J. Efeitos da suplementação com vitaminas C e E na resposta inflamatória aguda em *Piaractus mesopotamicus*. *Ciênc. Na. Bras. Go.*, v. 24, 2022.
- SADOUL, B.; GEFFROY, B. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *J. fish bio.* 2019, 94(4): 540-555.
- SALAH, A. S.; EL NAHAS, A. F.; MAHMOUD, S. Modulatory effect of different doses of β -1, 3/1, 6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*. *Fish & shellfish immunol.*, 2017, 70, 204-213.
- SANTOS, E. F.; TAVARES-DIAS, M.; PINHEIRO, D. A.; NEVES, L. R.; MARINHO, R. D. G. B.; DIAS, M. K. R. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no Estado do Amapá, Amazônia Oriental. *Acta Amazon.* 2013, 43: 105-111.
- SHAMA, S.; BRANDÃO, D. A.; VARGAS, A. C. D.; COSTA, M. M. D.; PEDROZO, A. F. Bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. *Ciência Rural* 2000, 30: 293-298.
- SOUZA, A. C. (2021). Importância das boas práticas de manejo sanitário na piscicultura de água doce.
- SOUZA, A. C. Importância das boas práticas de manejo sanitário na piscicultura de água em doce, 2021.
- SULYA, L. L.; BOX, B. E.; GUNTER, G. Plasma proteins in the blood of fishes from the Gulf of Mexico. *Americ. J. Physiol. Legacy Cont.*, 1961, 200(1), 152-154.
- SUMPTER, J. P. The endocrinology of stress. In *Fish Stress and Health in Aquaculture* (Iwama, G. K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P. & Schreck, C. B., eds), pp. 95–118. Cambridge: Cambridge University Press. 1997.
- TACHIBANA, L.; TELLI, G. S.; DIAS, D. D. C.; GONCALVES, G. S.; GUIMARAES, M. C.; ISHIKAWA, C. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects on growth performance, gut microbiota modulation and innate immunology. *Aquac. Res.* 2021, 52(4): 1630-1642.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *J. parasite. diseases* 2017, 41(4), 913-918.
- TEA, J.; ALDERMAN, S. L.; GILMOUR, K. M. (Social stress increases plasma cortisol and reduces forebrain cell proliferation in subordinate male zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Biology* 2019, 222(2): jeb194894.

- THATCHER, V.E. Amazon fish parasites. 2a Ed., Ed. Aquatic Biodiversity in Latin America, Sofia, Moscow. 508p. 2006.
- VAL, A. L.; WOOD, C. M.; WILSON, R. W.; GONZALEZ, R. J.; PATRICK, M. L.; BERGMAN, H. L.; NARAHARA, A. Responses of an Amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremely soft water. *Physiological Zoology* 1998, 71(6), 658-670.
- VALENÇA, A. R.; MENDES, G. N. Interferência de diferentes métodos de aclimação na sobrevivência de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931. *Acta Scient. Biological Sciences* 2009, 31(1), 9-16.
- VALLADA, E. P. Manual de técnicas hematológicas. S.P.: Atheneu, 1999. 423 p
- VARELA JUNIOR, A. S. Criopreservação seminal de tambaqui, *Colossoma macropomum*. 118 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.
- VIEIRA, R. B.; BARRETO, L. M.; FONSECA, K. Z.; LORDELO, M. S.; DE SOUZA, F. R.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S. Zootechnical performance evaluation of the use of biofloc technology in Nile tilapia fingerling production at different densities. *Bol. Inst. Pesc.* 2019, 45(4).
- YADA, T.; NAKANISHI, T. Interaction between endocrine and immune systems in fish. *Int. Rev. Cytol.* 2002, 220, 35–92.
- YADA, T.; TORT, L. Stress and Disease Resistance: Immune System and Immunoendocrine Interactions. In *Fish Physiology - Biology of Stress in Fish*, Vol. 35 (eds. C. B. Schreck, L. Tort, A. P. Farrell and C. J. Brauner), San Diego, CA: Academic Press. 2016.
- YADA, T.; TORT, L. Stress and Disease Resistance: Immune System and Immunoendocrine Interactions. In: Schreck, C.B.; Tort, L.; Farrel, A. P.; Brauner, C.J. *Fish Physiology – Biology of Stress in Fish*, Sand Diego, CA: Academic Pres, 2016.
- YAU, M. S.; LEI, E. N. Y.; NG, I. H. M.; YUEN, C. K. K.; LAM, J. C. W.; LAM, M. H. W. Changes in the neurotransmitter profile in the central nervous system of marine medaka (*Oryzias melastigma*) after exposure to brevetoxin PbTx-1—A multivariate approach to establish exposure biomarkers. *Sci. Total Env.* 2019, 673, 327-336.