



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Banhos terapêuticos com dióxido de cloro em jundiá, *Rhamdia quelen*, infestado com *Ichthyophthirius multifiliis*: hematologia e histopatologia

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura

Orientador: José Luiz Pedreira Mourião

Jessica Nunes de Melo

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Melo, Jessica Nunes de

Banhos terapêuticos com dióxido de cloro em jundiá,
Rhamdia quelen, infestado com Ichthyophthirius
multifiliis: hematologia e histopatologia. / Jessica Nunes
de Melo ; orientador, José Luiz Pedreira Mourião -
Florianópolis, SC, 2014.
66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Parasitologia. 3. Tratamento. 4.
Dióxido de cloro. 5. Bagre. I. Mourião, José Luiz Pedreira.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Banhos terapêuticos com dióxido de cloro em jundiá,
Rhamdia quelen, infestado com *Ichthyophthirius multifiliis*:
hematologia e histopatologia**

Por

JESSICA NUNES DE MELO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez – *Presidente*

Dr. Evoy Zaniboni Filho

Dr. Marcos Tavares Dias

Dr. Maurício Laterça Martins

Dedico este trabalho ao meu pai, José Nunes de Melo, por seu esforço e dedicação no meu crescimento pessoal, intelectual e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela sua graça de prover o ar que respiro, pela capacidade dada a mim de pensar, falar, agir, e buscar realizar os sonhos que Ele sonhou pra mim, que tudo seja por meio Dele, por Ele e para Ele.

Ao meu orientador, José Luiz Pedreira Mouriño, por ter me aceitado como orientada primeiramente, e me guiar na escolha e execução do projeto, além da orientação na escrita, além dos momentos de descontração e amizade.

Ao professor Maurício Laterça Martins pelo acompanhamento durante o mestrado e por me receber durante as análises em seu laboratório.

A Empresa Dioxide pelo apoio financeiro, a compreensão do Wilson Carneseca e ainda pelas conversas sobre o dióxido de cloro e seus usos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Santa Catarina pelos conhecimentos repassados.

A Patrícia Garcia pelo treinamento na histologia.

A Scheila Pereira pela amizade e também pela cooperação no trabalho.

Aos colegas de Pós-graduação, cada um com sua história de vida e superação, me ajudaram na caminhada do mestrado.

Aos colegas do laboratório de microbiologia do LCM, foi ótimo trabalhar com vocês galera: Scheila, Mari, Gabi Soltes, Norha, Gabi Pereira, Juliana, Marcela, Marysol, Bruno, Marcello, Gabriel, Felipe, Carlos.

A todos os funcionários do LCM que de maneira indireta contribuíram no meu trabalho.

Aos colegas do laboratório AQUOS, que me ajudaram na realização do experimento e nessa reta final do mestrado: Eduardo, Douglas, Lucas, Karen, Gabi, Jorge, Natália, Osvaldo, Jennifer, Aline.

A todos os funcionários do AQUOS que de maneira indireta contribuíram no meu trabalho.

Aos amigos da Primeira Igreja Batista de Florianópolis pelos momentos de comunhão e pelo suporte espiritual na minha vida.

A Família Schimdt sempre acolhedora e querida: tia Ângela e tio Vandir, Priscila e Meire, gosto muito de vocês.

Ao grupo de jovens da PIB-Floripa que tornou os dias em Florianópolis ainda melhores e super divertidos: Ruth, Sheila, Lauren, Angélica, Nathan, Carol, Clarissa, Efraim, Fran, Gustavo, Leonel, Marco Antônio, Tiago, Oziel, Rafael, André e Ruth Mary.

As amigas super especiais da célula “Bem-aventuradas” Alessandra, D. Betânia, Thalessa, Manu, Aninha, Ester, Ivone, Carol, Camila e Marcela pela amizade, pelos momentos divertidos, pela convivência, pelas conversas, e por todo o suporte que me deram durante esse tempo em Florianópolis.

Aos amigos da Igreja Bíblica Batista Nova Esperança em Fortaleza por sempre se lembrarem de mim em suas orações.

A Eunice, Carol e Idenir, família que me acolheu muito bem no último ano de mestrado, mesmo eu sendo só a inquilina da edícula.

Aos amigos de Fortaleza, que provaram ser verdadeiros apesar de toda a distância, Soraya, Nathália, e Benaia.

Ao amigo Custódio por seus ensinamentos e conselhos, e à sua família por sempre me receber tão bem em Curitiba.

A grande família em Fortaleza, avós, tios, tias, primos e primas, que sempre me apoiaram em buscar algo melhor, obrigada pelo suporte aos meus pais durante minha ausência.

A meu querido pai, por todo apoio dado, e por tantas vezes ter provido suporte para essa conquista, obrigada pela generosidade, carinho, cuidado, e amor que tem por mim.

A minha mãe pelas orações e preces a Deus pela minha vida.

Ao meu irmão por cuidar dos nossos pais enquanto eu estou morando longe.

Enfim, agradeço a cada um que passou pela minha vida e contribuiu para meu crescimento pessoal e profissional.

“E disse Deus: Encham-se as água de seres vivos... Assim Deus criou os grandes animais aquáticos e os demais seres vivos que povoam as águas, de acordo com as suas espécies... e viu Deus que era bom.”

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo contribuir para a sanidade aquícola em busca de tratamentos efetivos contra a ictiofitiríase em jundiá, *Rhamdia quelen*. O experimento foi dividido em ensaios *in vitro* e *in vivo*. O ensaio *in vitro* foi realizado para determinar a menor concentração de dióxido de cloro (ClO_2) capaz de imobilizar terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. O ensaio *in vivo* buscou conhecer os possíveis efeitos tóxicos do dióxido de cloro em jundiás saudáveis expostos por 96 horas em 10 diferentes concentrações. Ao final da exposição, foram realizadas análises hematológicas e brânquias, rim e fígado foram coletados para avaliação histopatológica. Em seguida, peixes parasitados (grau de severidade 3) por *I. multifiliis* foram expostos ao dióxido de cloro em três concentrações definidas no teste de toxicidade, para serem coletados muco e brânquias para quantificação parasitológica pós tratamento. Em outro experimento, foi determinado o efeito da exposição por 1 hora ao dióxido de cloro (25 ppm, 125 ppm, 250 ppm) em peixes parasitados por *I. multifiliis*. O dióxido de cloro foi efetivo para imobilizar terontes de *I. multifiliis* a 25 ppm de ClO_2 , causando redução da infestação nas brânquias de jundiás, à exposição curta por 1 h à concentração de 125 ppm e 250 ppm e prolongada por 48 h à concentração de 25 ppm de ClO_2 . Não houve diferenças na hematologia de peixes parasitados tratados ou não com o oxidante. Alterações histopatológicas foram observadas em brânquias, fígado e rim de jundiás expostos ao dióxido de cloro, entretanto houve diferença significativa apenas em algumas das alterações observadas em relação aos não tratados. Tratamentos terapêuticos com dióxido de cloro a 25 ppm podem ser indicados para reduzir infestações causadas por *I. multifiliis* sem alterar a saúde dos peixes.

Palavras-chave: Bagre, tratamento, Protozoa, desinfetante, sanidade aquícola.

ABSTRACT

This study contributes to aquaculture fish health by evaluating the effective treatments against ictiofitiriasis in *Rhamdia quelen*. The experiment was divided into *in vitro* and *in vivo* assays. The *in vitro* assay was conducted to determine the lowest concentration of chlorine dioxide (ClO₂) capable in immobilizing teronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. In *in vivo* assay the possible toxic effects of chlorine dioxide on healthy silver catfish exposed for 96 hours in 10 different concentrations was investigated. At the end of exposure period, blood was collected for hematological analysis, and internal organs (gills, kidney and liver) collected for histopathological evaluation. Afterwards, fish parasitized with *I. multifiliis* (severity 3) were exposed for 48 h in three concentrations of chlorine dioxide and the mucus and gills were collected for parasitological quantification after treatment. In another experiment, the effect of 1 h exposure of chlorine dioxide (25 ppm , 125 ppm , 250 ppm) in fish infected by Ich was determined. 250 ppm concentration of ClO₂ was effective to reduce the infestation of the gills silver catfish for 1 h. There were no significant differences in hematological parameter of exposed or unexposed fish. Histopathological changes were observed in gills, liver and kidney of silver catfish exposed to chlorine dioxide, however significant difference was observed only in some of the changes observed in comparison to untreated fish. Therapeutic treatments with chlorine dioxide at 25 ppm can be given to reduce infestations caused by *I. multifiliis* without changing fish health.

Keywords: Catfish, treatment, Protozoa, disinfectant, aquaculture sanity.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1. Produção mundial de pescado com produção da Pesca e Aquicultura separadamente de 2002 a 2011. Fonte: Adaptado de FAO (2012)..... 21
- Figura 2. Produção mundial de siluriformes de 2000 a 2011, em toneladas por ano. Fonte: Adaptado de FAO-FIGIS (FAO-FIGIS, 2014) 22
- Figura 3. Produção total brasileira de siluriformes e jundiás de 1990 a 2011, em toneladas por ano. Fonte: Adaptado de FAO-FIGIS (FAO-FIGIS, 2014)..... 23
- Figura 4. Espécime de jundiá, *Rhamdia quelen* 25
- Figura 5. Artigos publicados sobre o parasito protozoário *Ichthyophthirius multifiliis*, de 1953 a 2012. Fonte: ScienceDirect 28
- Figura 6. Ilustração do ciclo de vida do *Ichthyophthirius multifiliis* por Coyne et al. (2011)..... 29

Artigo

- Figura 1. Contagem de *Ichthyophthirius multifiliis* no muco de jundiás, *Rhamdia quelen*, tratados com dióxido de cloro ClO₂ a 0 ppm, 25 ppm, 35 ppm e 45 ppm por 48 h..... 50
- Figura 2. Contagem de *Ichthyophthirius multifiliis* nas brânquias de jundiás, *Rhamdia quelen*, tratados com dióxido de cloro ClO₂ a 0 ppm, 25 ppm, 35 ppm e 45 ppm por 48 h. ^{a,b}- letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey p= 0,002 51
- Figura 3. *Ichthyophthirius multifiliis* nas brânquias de jundiás *Rhamdia quelen* após banhos de 1 hora com dióxido de cloro (ClO₂) nos tratamentos 0 ppm, 25 ppm, 125 ppm e 250 ppm. ^{a,b}- indica diferença significativa no teste de Tukey (p=0,001) 52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos em jundiás *Rhamdia quelen* após 96 h ao dióxido de cloro (ClO₂) nas concentrações de 0 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm .. 44
- Tabela 2. Alterações histológicas observadas em brânquias de jundiás *Rhamdia quelen* expostos a dióxido de cloro ClO₂ a 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm e grupo controle por 96 h 45
- Tabela 3. Alterações histológicas observadas em fígados de jundiás, *Rhamdia quelen*, expostos a dióxido de cloro ClO₂ a 0 ppm, 25 ppm, 35 ppm e 45 ppm por 96 h..... 47
- Tabela 4. Alterações histológicas observadas em rins de jundiás *Rhamdia quelen* expostos a dióxido de cloro ClO₂ a 0 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm por 96 h 48
- Tabela 5. Razão de risco e intervalo de confiança (IC) de ocorrência das lesões em brânquias, fígado e rins de jundiás quando expostos ao dióxido de cloro ClO₂ a 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm por 96 h..... 49
- Tabela 6. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos em jundiás *Rhamdia quelen* parasitados após 1 h ao dióxido de cloro (ClO₂) nas concentrações de 0 ppm, 25 ppm, 125 ppm e 250 ppm por 1 h..... 53

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	21
INTRODUÇÃO	21
Importância do cultivo de Siluriformes	22
Características do jundiá <i>Rhamdia quelen</i>, e sua importância para a região sul do Brasil	23
Principais parasitoses em jundiá, <i>Rhamdia quelen</i>	26
Ictiofitiríase em Siluriformes	27
Características do <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> Fouquet, (1876)	28
Substâncias químicas utilizadas para o tratamento da ictiofitiríase em peixes	29
Parâmetros de saúde de peixes	31
JUSTIFICATIVA	34
OBJETIVO GERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
CAPÍTULO 2	36
DIÓXIDO DE CLORO NO TRATAMENTO DE JUNDIÁS (<i>Rhamdia quelen</i>) PARASITADOS POR <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>: HEMATOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS, FÍGADO E RIM	36
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS	38
Material biológico.....	38
Agente químico.....	39
Ensaio de imobilização de terontes de <i>I. multifiliis</i> por ClO ₂	39
Determinação do grau de infestação.....	40
Análises hematológicas.....	40
Análises Parasitológicas.....	41
Análise histopatológica.....	41

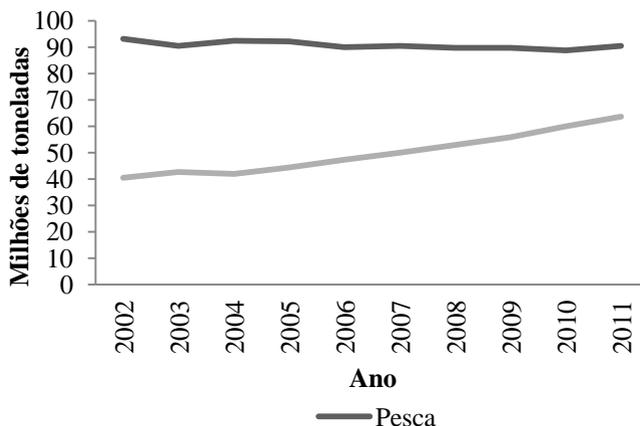
Análises estatísticas.....	41
Exposição prolongada de jundiás <i>Rhamdia quelen</i> saudáveis ao ClO ₂ durante 96 h - Ensaio 1	42
Exposição prolongada de jundiás <i>Rhamdia quelen</i> parasitados ao dióxido de cloro ClO ₂ durante 48 h - Ensaio 2	42
Exposição curta de jundiás <i>Rhamdia quelen</i> parasitados a dióxido de cloro ClO ₂ durante 1 h - Ensaio 4	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	54
AGRADECIMENTOS.....	55
REFERÊNCIAS.....	55
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	59

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Em 2010, a pesca e aquicultura produziram cerca de 148 milhões de toneladas de pescado, (gerando aproximados 435 bilhões de reais). Dessa produção 128 milhões de toneladas foram utilizadas como alimento humano. Dados preliminares de 2011 indicam aumento da produção para 154 milhões de toneladas, sendo que 131 milhões de toneladas serão destinadas para alimentação humana (FAO, 2012).

Figura 1. Produção mundial de pescado com produção da Pesca e Aquicultura separadamente de 2002 a 2011. Fonte: Adaptado de FAO (2012).



A aquicultura é considerada uma alternativa para diminuir a pressão da pesca sobre os estoques pesqueiros naturais, como também para reduzir os impactos negativos que a exploração pesqueira indiscriminada pode causar nos ecossistemas aquáticos (ROTTA, 2003).

A aquicultura apresenta contínuo crescimento em todo o mundo, sendo que em 2011, a aquicultura continental e marinha apresentaram crescimento de 5,81% em relação ao ano anterior, enquanto que a pesca registrou crescimento de apenas 1,99 % em relação ao mesmo período como mostrado na FIGURA 1 (FAO, 2012).

No ano de 2011 a produção da aquicultura continental brasileira foi de 479.399 toneladas, o que coloca o País como décimo oitavo produtor mundial e terceiro maior produtor das Américas contribuindo

com 18,61 % da produção total deste continente e apenas 0,86 % da produção mundial (FAO, 2012).

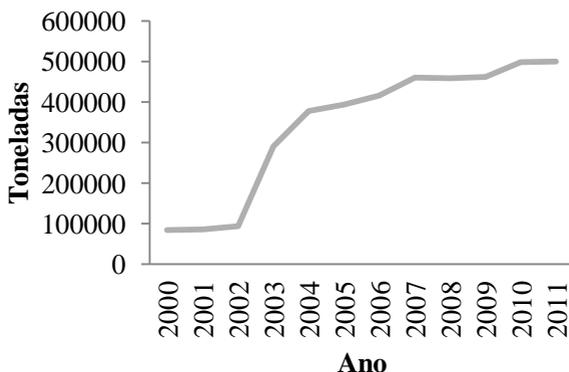
Devido à grande extensão e variações climáticas encontradas no Brasil há grande diversidade de espécies cultivadas, desde espécies exóticas e com elevada taxas de produção a espécies nativas com baixa produção, porém com grande potencial zootécnico (BALDISSEROTTO; GOMES, 2010).

Dentre as espécies de peixes nativas com boa capacidade produtiva no Brasil, alguns Siluriformes estão sendo cultivados com sucesso, tais como: pintado (8.824,3 t), “bagre” (7.048,1 t) e jundiá (1.747,3 t), que juntos representam apenas 3,67 % do total produzido na aquicultura no País (BRASIL, 2011), mostrando que há potencial produtivo a ser desenvolvido para essas espécies, devido a boa procura do mercado.

Importância do cultivo de Siluriformes

A produção mundial de Siluriformes cresce ao longo dos últimos anos, com taxa média de 12,8 % ao ano, saltando de 84.409 t em 2000 para 499.693 t em 2011, conforme mostra a Figura 2 (FAO, 2013). O interesse no cultivo deste grupo de peixes é devido a alguns fatores, tais como: boas taxas de crescimento, alto valor comercial, alto rendimento de carcaça, carne saborosa, baixo teor de gordura além da ausência de espinhos intramusculares.

Figura 2. Produção mundial de siluriformes de 2000 a 2011, em toneladas por ano. Fonte: Adaptado de FAO-FIGIS (FAO-FIGIS, 2014).

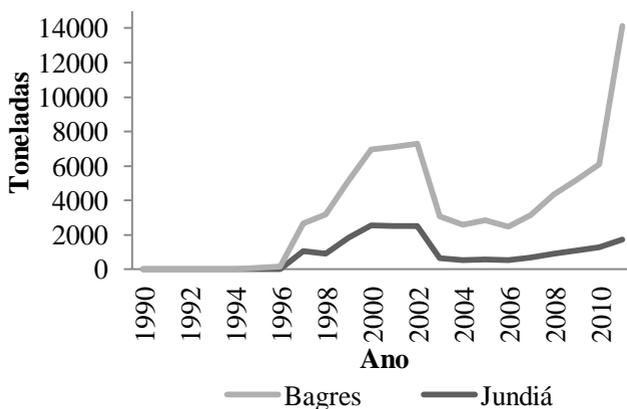


No Brasil a produção total de Siluriformes cresceu também nos últimos anos. Houve um aumento significativo na produção à partir de 2003, o que se deve principalmente ao aumento na produção de surubins híbridos *Pseudoplatystoma* spp. A produção de bagres neste período saltou de 821,5 t (2003) a 8.824,3 t (2011), representando um crescimento de 1074,2 % (FIGURA 2) e modificando o patamar da produção de bagres no País (BRASIL, 2011).

Já a produção brasileira de jundiás cultivados em 2011 foi de 1747 toneladas. Na Figura 3 observa-se uma tendência de recuperação da produção a partir de 2007, após alguns anos com estagnação na produção (FAO, 2013).

Segundo Fracalossi et al (2004) para que as espécies nativas sejam produzidas em larga escala, é necessária a realização de pesquisas visando os índices zootécnicos compatíveis aos das não nativas, características organolépticas desejáveis e boa aceitação pelo mercado consumidor.

Figura 3. Produção total brasileira de siluriformes e jundiás de 1990 a 2011, em toneladas por ano. Fonte: Adaptado de FAO-FIGIS (FAO-FIGIS, 2014).



Características do jundiá *Rhamdia quelen*, e sua importância para a região sul do Brasil

O jundiá pertence à seguinte divisão taxonômica: Classe: Osteichthyes, Série: Teleostei, Ordem: Siluriformes, Família: Pimelodidae, Gênero: *Rhamdia*, Espécie: *Rhamdia quelen*. Peixe de

couro onívoro, sua cor varia de marrom-claro a cinza, com a parte ventral do corpo mais clara (FIGURA 4), possui ampla distribuição geográfica, com ocorrência registrada desde a parte central da Argentina até o sul do México (SILFVERGRIP, 1996). Habita lagos e rios, próximo a barrancos mais inclinados com abrigos, ou perto de troncos submersos, tem preferência por profundidades entre 0 a 2 m, onde encontra temperaturas e concentrações de oxigênio mais altas (SCHULZ; LEUCHTENBERGER, 2006). Essa espécie apresenta boas características zootécnicas, suportando grandes variações de oxigênio dissolvido, pH e temperatura da água, e os reprodutores podem ser facilmente induzidos à desova com diversos tipos de hormônios (ZANIBONI-FILHO et al., 2004).

O cultivo do jundiá em Santa Catarina tem sido estimulado desde 2006 pela Empresa de Pesquisa e Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) após uma viagem de estudos por diversas universidades brasileiras. Os pesquisadores elegeram o jundiá como espécie-alvo, por ser uma espécie bem conhecida pelos produtores rurais e estar presente em todas as regiões do estado (AMARAL-JÚNIOR, 2013) além das boas características zootécnicas, tais como: taxa de crescimento específico de 4 % ao dia de larvas criadas em ambiente escuro contra 2 % em ambiente claro, taxa de conversão alimentar de 1,18 : 1 em monocultivo para juvenis, adaptação ao frio no Sul do País, ausência de espinhos intramusculares, percentual de 17 % de proteína e 3 % de gordura em filés de 200 - 450 g, e um bom rendimento em filés sem pele de 30 a 42 % do peso corporal (AMARAL-JÚNIOR, 2013; BARCELLOS, 2013).

As características zootécnicas dos jundiás mais importantes durante o cultivo serão comentadas a seguir, dentre elas a concentração mínima letal de oxigênio dissolvido na água, que para esta espécie é de 0,52 mg.L⁻¹, no entanto um nível mínimo de 5,2 mg.L⁻¹ é o recomendado por Braun et al, (2006) para manter boas condições de crescimento destes peixes. Alevinos de *R. quelen* suportam variação de salinidade de 0 ‰ a 10 ‰, o que indica que esses animais são eurialinos (MARCHIORO, 1997). A concentração de nitrito para não interferir no crescimento de alevinos de jundiá deve ficar abaixo de 1,19 mg/L segundo Lima (2005). Neste mesmo trabalho o autor realizou experimentos em que os alevinos suportaram variação de pH na faixa de 4,0 a 8,5 (considerando uma dureza de 30,0 mg/L⁻¹ CaCO₃). Entretanto segundo Lopes & Silva (1998) relataram que o melhor crescimento das larvas ocorre na faixa de pH de 8,0 a 8,5. No estudo de Weiss (2012) juvenis de jundiás foram expostos experimentalmente a amônia (NH₃),

para determinar a concentração letal mínima de amônia, que foi de 2,99 a 1,91 mg L⁻¹.

O cultivo do jundiá em Santa Catarina é predominantemente realizado de forma semi-intensiva, em viveiros de terra (BALDISSEROTO; RADÜNZ, 2004). Os melhores resultados são obtidos cultivando animais monossexo feminilizados com 17 β-estradiol, em sistema de monocultivo em viveiros de terra, na densidade de 1,5 peixes/m², com aeração suplementar, e controle de predadores. Nessas condições de cultivo os autores encontraram ganho de peso diário de 2,26 g, sobrevivência de 90,37 % e taxa de conversão alimentar de 1,30 :1 durante 25 semanas de cultivos, resultados encorajadores para a continuação do cultivo da espécie (Amaral-Júnior, 2013).

Figura 4. Espécime de jundiá, *Rhamdia quelen*.



Fonte: Melo, J.N.

Quanto às características reprodutivas, essa espécie é ovulípara, desovam em cardumes procurando lugares de água rasa, limpa, pouco corrente e com fundo pedregoso. Os ovos são demersais e não aderentes, e não há cuidado parental. Durante o cultivo, é necessário realizar propagação artificial com boas respostas ao uso de hormônios ou hipófise (GOMES et al., 2000).

Há várias lacunas que precisam ser preenchidas para o estabelecimento de um pacote tecnológico do cultivo do jundiá, tais como: ração de boa qualidade e que atenda as exigências nutricionais, cultivo de animais monossexo, melhoramento genético das linhagens atuais, e tratamentos eficazes contra doenças parasitárias como a

Ictiofitiríase (BALDISSEROTTO; GOMES, 2010). O controle das infestações por Ictio principalmente durante as primeiras semanas de vida do jundiá (CARNEIRO et al., 2005) é um dos principais desafios para alavancar o desenvolvimento do cultivo da espécie devido à sua susceptibilidade.

Principais parasitoses em jundiá, *Rhamdia quelen*

Serão abordados a seguir os principais parasitos causadores de mortalidade e prejuízos econômicos em cultivo de jundiás, sendo responsável por 8,3 % dos casos (BALDISSEROTTO; RADÚNZ, 2004) das doenças nessa espécie.

Algumas espécies de Monogenea podem parasitar peixes, anfíbios, e répteis, causando problemas para peixes nos cultivos (LUQUE, 2004). Em jundiá de ambiente natural foi reportada a ocorrência de *Aphanoblastella* sp. (Monogenea) com abundância média de 71.4 ± 64.5 parasitos/peixe, entretanto não houve correlação entre o peso dos peixes e a abundância média encontrada (VENANCIO et al., 2010).

Alguns crustáceos aquáticos também são parasitos, e possuem apêndices orais e natatórios modificados para órgãos de fixação. A *Lernaea cyprinacea* foi introduzida no Brasil com a importação de carpas húngaras, e se espalhou para outros cultivos (LUQUE, 2004), infestando inclusive jundiás oriundos de cultivos no Rio Grande do Sul (MABILIA; SOUZA, 2008).

Outros parasitos que ocorrem no cultivo de jundiás são do gênero *Argulus* (possuem ventosas), e do gênero *Dolops*, conhecidos popularmente como “piolhos de peixe” (LUQUE, 2004). Parasitismo por esses crustáceos podem causar mortalidades elevadas de alevinos e adultos nas pisciculturas, além de serem possíveis vetores de doenças virais e, prováveis hospedeiros definitivos de hemoparasitos de peixes (EIRAS, 1994)

Dentre todos os parasitos de peixes citados, também há os protozoários, entre eles a *Trichodina* sp, que são parasitos de forma circular e ciliados e podem coexistir normalmente nos tanques de cultivo, porém proliferam em águas com excesso de material em decomposição podendo acarretar sérios quadros patológicos (MADSEN et al., 2000). Em Santa Catarina, foi relatada uma nova espécie de *Trichodina* sp parasitando jundiás com maior prevalência em locais poluídos (HASHIMOTO, 2012), isso denota a importância do controle

da qualidade da água para evitar o aumento das infestações por esse protozoário.

Outro protozoário que também causa grandes problemas e prejuízo econômico em cultivos é o *Ichthyophthirius multifiliis*, ectoparasito ciliado não específico, parasita pele e brânquias de peixes de água doce (DICKERSON, 2006).

Estes parasitas são os mais frequentes em jundiás, causando as maiores perdas produtivas por mortalidade por *I. multifiliis* (CARNEIRO et al., 2005; VARGAS et al., 2008), visto que as infestações são rápidas e o aumento parasitário exponencial, de difícil controle após o produtor percebê-las.

Ictiofitiríase em Siluriformes

A ictiofitiríase, “Ictio”, ou “doença dos pontos brancos” como popularmente é conhecida é uma das doenças mais patogênicas causadas por protozoários parasitas de peixes (MATTHEWS, 2005). Os trofontes encistados entre a derme e epiderme dos peixes tem a aparência de pequenos nódulos brancos espalhados por toda a superfície corporal. Esses nódulos são ligeiramente salientes e medem de 0.1 - 1.0 mm e aparentam adesividade, formando massas mucóides sobre a pele. Em peixes muito infestados é pouco provável que sobrevivam, mesmo se forem tratados (NOGA, 2010).

Erosão epitelial e ulceração são causadas pela entrada e saída ao atingir o estágio adulto do parasito no hospedeiro. As lesões ocorrem na pele, nadadeiras, filamentos branquiais, e córneas de vários hospedeiros de água doce, podendo ocorrer até o surgimento de pústulas (OLSEN, 1974). Segundo Xu et al, (2012) a infecção por Ictio predispõe a infecções secundárias por bactérias como *Edwardsiella ictaluri* o que torna a doença ainda mais letal.

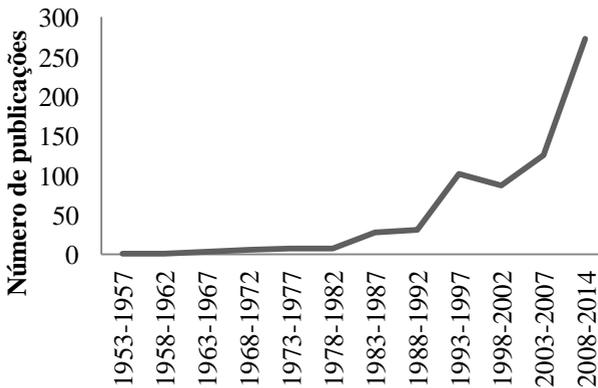
A ictiofitiríase em jundiás está diretamente relacionada à idade dos peixes, sendo muito comum entre os jundiás jovens (3-5 cm), que são severamente susceptíveis ao protozoário (BALDISSEROTTO, 2004), pois perdem a imunidade materna transferida já nos primeiros estágios larvais e só irão desenvolver imunidade adquirida quando expostos ao antígeno (BARCELLOS, 2013). Os alevinos são mais afetados que os adultos (NOGA, 2010), que geralmente são mais resistentes ou apresentam menor número de parasitos em razão da maior eficiência da resposta imunológica (MARTINS et al., 2011). Todas as espécies de peixes de água doce são prováveis hospedeiros de Ictio, mas espécies sem escamas como os bagres são particularmente mais

vulneráveis, podendo ocorrer até 100 % de mortalidade em poucos dias (NOGA, 2010).

Os prejuízos causados por essas mortalidades podem ser enormes, afetando muitos produtores. Em 2001, as perdas causadas diretamente pelo Ictio causaram um prejuízo de U\$ 1.200.000,0 aos produtores de catfish nos Estados Unidos (SHOEMAKER, 2010).

Muitos estudos sobre o protozoário *I. multifiliis* têm sido realizados, principalmente na última década (FIGURA 7). Isso ocorre provavelmente devido ao crescimento da aquicultura mundial, através da intensificação e aumento dos cultivos que podem causar desequilíbrios nos sistemas de criação aumentando o surgimento de doenças infecciosas e/ou parasitárias, e com isso a busca do controle/erradicação dessa doença nos cultivos.

Figura 5. Artigos publicados sobre o protozoário *Ichthyophthirius multifiliis*, de 1953 a 2012. Fonte: ScienceDirect (2014).



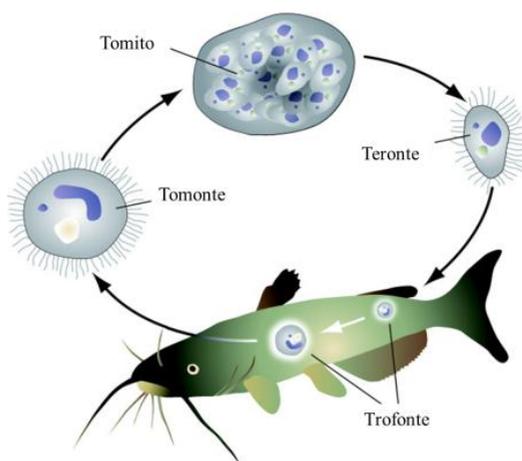
Estes parasitos também ocorrem em ambientes naturais e podem causar infestações tão devastadoras quanto em ambientes de cultivo. Exemplo disso foi um surto de Ictio que causou a morte de aproximadamente 18 milhões de peixes-rei (*Orestias agassi*) no Lago Titicaca, Peru em 1981 (WURSTBAUGH; TAPIA, 1988).

Características do *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, (1876)

O *Ichthyophthirius multifiliis* é um protozoário parasito que tem o ciclo de vida direto em três estágios: uma fase reprodutiva, o tomonte,

um teronte infectivo (forma livre natante que irá penetrar no tecido do peixe) e um trofante, parasitando o epitélio. Todos os estágios são ciliados e móveis (DICKERSON, 2006), o teronte natante perfura a pele do hospedeiro com um aparato chamado *perforatorium*, e em poucos minutos se diferencia a um trofante. O trofante cresce rapidamente, se alimentando do hospedeiro. Podendo permanecer vários dias encistado dependendo das condições da água e do estado imune do peixe.

Figura 6. Ilustração do ciclo de vida do *Ichthyophthirius multifiliis* por Coyne et al. (2011).



Ao atingir a maturidade, que depende de muitos fatores, ele deixa o hospedeiro e fica livre na água como tomonte, nadando livre por até 1 hora até se fixar em algum substrato. Depois de fixado, o tomonte sofre sucessivas divisões celulares, dobrando o número de células-filha a cada hora, estas células são os tomites. Após isso, os tomites se diferenciam a terontes infectantes, que rompem a parede do cisto, nadando a procura de outro hospedeiro (DICKERSON, 2006).

Substâncias químicas utilizadas para o tratamento da ictiofitiríase em peixes

Vários estudos tem sido conduzidos visando o tratamento/controlar da ictiofitiríase em diversas espécies de peixes, entre usando o sal comum (NaCl) (ROWLAND et al., 2008), sulfato de cobre (TAVARES-DIAS et al., 2011), verde de malaquita

(SRIVASTAVA et al., 2004), formalina (KLEIN et al., 2004), permanganato de potássio (HEINECKE; BUCHMANN, 2009), cloramina-T (ALTINOK, 2004) e o dióxido de cloro (YAMABE; YOSHIDA, 1990).

A cloramina-T (Sulfonamida p-Tolueno de sódio) é um desinfetante oxidativo a base de cloro, na água ela é decomposta e age quebrando lentamente o ácido hipocloroso, liberando oxigênio e cloro (LECHEVALLIER; AU, 2004). Estudos mostram sua eficácia em controlar infestações por *I. multifiliis* e *Ichthyobodo necator* em truta arco-íris (OSTLAND et al., 1995). Sua utilização também foi bem sucedida para tratar columnariose (BULLOCK et al., 1991) e monogenéticos (LECHEVALLIER; AU, 2004). Concentrações entre 8,5 e 12 mg/L controlaram com sucesso doença branquial bacteriana em truta arco-íris (BULLOCK et al., 1991).

O formaldeído é um produto natural do metabolismo, sendo comum o uso de formalina comercial (37 - 40 % formaldeído) como medida profilática e/ou terapêutica em pisciculturas para controlar protozoários, monogenéticos e fungos (NOGA, 2010). Tratamentos curativos contra *I. multifiliis* e outros parasitos são realizados por repetições de banhos curtos geralmente a 100 - 250 mg/L. Tratamentos com banhos longos em baixas concentrações também mostraram ser eficazes contra *I. multifiliis* e contra *Gyrodactylos sp* (SORTKJÆR et al., 2008).

O sulfato de cobre (CuSO_4) por sua vez tem sido considerado um dos mais eficazes produtos químicos contra diversas infecções parasitárias e ainda outras doenças. Tem sido amplamente utilizados no tratamento de infecções causadas por protozoários (CARNEIRO et al., 2005) e monogenéticos (TAVARES-DIAS et al., 2011). Apresenta baixo custo, mas pode ser altamente tóxico para os peixes em água com baixa alcalinidade (STRAUS, 2008), havendo necessidade de acompanhamento dos parâmetros de água antes de sua aplicação.

O dióxido de cloro (ClO_2) é um desinfetante oxidativo a base de cloro utilizado no tratamento de água, e de uso seguro para humanos (BERG et al., 1980). Esse produto tem sido estudado intensamente, com pesquisas mostrando sua ação contra vírus, bactérias, algas, zooplâncton, fungos e protozoários no tratamento de água (HUANG et al., 1997; JUNLI et al., 1997). Além disso, o dióxido de cloro não gera resíduos tóxicos nitrogenados, como as cloraminas (ROSENBLATT, 1978) ou resíduos carcinogênicos como as trihalometanos (BLOCK, 2001).

Quando aplicado na concentração de 15 ppm contra *I. multifiliis* em *Carassius auratus* mostrou efeito curativo, e efeito preventivo a reinfeção a 5 ppm (YAMABE; YOSHIDA, 1990). A utilização deste desinfetante é eficaz também contra outros protozoários através do tratamento da água, tais como: *Giardia lamblia* (LECHEVALLIER; AU, 2004), e em oocistos de *Cryptosporidium parvum* com 90 % de inativação dos cistos após uma hora em humanos (KORICH et al., 1990).

Além de apresentar uma menor toxicidade, o dióxido de cloro apresenta uma maior eficiência em diversos usos como fungicida, bactericida, protocida, algicida (BERG et al., 1980; DONNELLY; STENTIFORD, 1997; FINCH; LI, 1999; HUANG et al., 1997; JUNLI et al., 1997; KIM et al., 1999; KIM et al., 2008; KORICH et al., 1990; ORTEGA et al., 2008; SMAIL et al., 2004; SOLOMON, 1996) o que tem fortemente sugerido a substituição do cloro pelo dióxido de cloro e utilização segura. A utilização do dióxido de cloro também tem sido incluída no tratamento de pescados para prolongamento da vida de prateleira através da redução da carga bacteriana (KIM et al., 1999).

Parâmetros de saúde de peixes

O estudo do sangue dos peixes é uma ferramenta que permite avaliar a condição de saúde dos peixes, avaliando as defesas orgânicas e permitindo identificar a forma de reação dos peixes a diferentes ambientes, situações estressoras ou não (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Tilápias parasitadas por *I. multifiliis* apresentam anemia, com diminuição do número de eritrócitos, de linfócitos, da taxa hemoglobina, do percentual do hematócrito e ainda da hemoglobina corpuscular média em relação ao controle (TAVARES-DIAS et al., 2002). Por outro lado, ocorreu aumento do volume corpuscular médio (VCM) e aumento percentual de neutrófilos e monócitos.

A histopatologia é também uma ferramenta para avaliar o estado de saúde de peixes. Alterações histológicas podem ocorrer quando peixes são expostos a diferentes agentes químicos, ou a poluentes no ambiente aquático e tem se mostrado eficientes biomarcadores da saúde dos peixes (BOWKER et al., 2011; ELSAYED et al., 2006; RAISSY; ANSARI, 2011; STENTIFORD et al., 2003; YU et al., 2012).

Apesar da utilização comercial dos produtos químicos citados anteriormente, são necessárias pesquisas sobre o quadro de saúde dos peixes durante as aplicações bem como a prevenção de riscos ao meio

ambiente. De uma forma geral, os produtos químicos causam boas respostas nas reduções de infestação parasitária ou bacteriana, entretanto é necessário avaliar o grau de dano acometido aos organismos tratados, sendo que a histopatologia é uma técnica incisiva nesse sentido, visto que é possível notar as alterações causadas e determinar o grau de severidade das mesmas.

A formalina, um dos produtos químicos amplamente utilizados em cultivos de peixes, mostrou causar severos danos histológicos em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, quando expostas a 167 e 250 ppm de formalina por 1 h, bem como causou diminuição no percentual de hematócrito e aumento no número de células imaturas em provável resposta a hipoxia (SMITH; PIPER, 1972).

O sulfato de cobre (CuSO_4) tem sido provado como bom desinfetante contra parasitos, porém pode causar alterações histológicas em peixes. Quando carpas foram experimentalmente expostas em cinco diferentes concentrações de sulfato de cobre foram observadas lesões no epitélio branquial, tais como: mudanças nas células cloreto, hiperemia, ondulação das lamelas secundárias, hiperplasia lamelar, e ainda relação dose-dependência das lesões, entretanto após um período de recuperação, os peixes voltavam a homeostase (KARAN et al., 1998).

Straus et al. (2012) relataram que larvas recém-eclodidas de bagre-do-canal *Ictalurus punctatus* tratadas com ácido peracético a 1,7 e 2,2 ppm durante 48 h via imersão apresentavam lesões de categoria moderada no rim, sendo a principal degeneração do epitélio tubular.

Alterações histológicas em estudos de toxicidade com o dióxido de cloro foram reportados por Yonkos et al. (2000), em que os peixes apresentaram patologia nas brânquias, porém com rápida recuperação (4 dias) após cessar a exposição ao produto.

Peixes que vivem em habitat com aporte de poluentes também estão suscetíveis a alterações histopatológicas, exemplo disso foi quando jundiás coletados de ambiente poluído por derramamento de óleo apresentaram várias áreas de necrose no fígado (PILCHOWSKI, 2012). A necrose dos órgãos causa prejuízos funcionais e estruturais nos peixes, diminuindo a funcionalidade, podendo ocorrer falência dos órgãos e morte dos peixes (STENTIFORD et al., 2003).

Em ambiente poluído pelo herbicida Clomazone utilizado na rizicultura também foram observadas alteração histológicas em jundiás, com áreas de fibrose e necrose no fígado, contrastando do fígado de peixes oriundos de piscicultura sem fonte poluidora (BRUM, et al. 2003).

Lesões no fígado e brânquias, tais como degeneração do epitélio tubular, e descamação e necrose do epitélio branquial respectivamente, foram relatados em peixes expostos a deltametrina, um inseticida de uso comum e de alto risco biológico (CENGIZ, 2006).

A partir disso, evidencia-se a utilização da histologia como uma ferramenta capaz de elucidar o efeito de algum agente agressor no habitat natural ou em ambiente de cultivo. Na ocorrência de um derramamento de óleo no Rio Iguaçu, foi realizado um estudo com vários peixes visando observar o o efeito da exposição aos órgãos dos peixes, foram percebidas diversas alterações histológicas, que permitiram a avaliação do estado de saúde dos peixes, e até a regeneração das lesões (BOEGER et al., 2003).

JUSTIFICATIVA

Diante dos prejuízos causados por *I. multifiliis* no cultivo de jundiás em Santa Catarina e por ser um entrave para o deslanche do cultivo desta espécie na região Sul do país, é de fundamental importância buscar estratégias de controle para combater as infestações causadas por este parasito sem causar danos aos animais e ao meio ambiente. Além de adotar um bom manejo, é comum a realização de tratamentos terapêuticos químicos através da água. Várias pesquisas têm sido realizadas com diferentes produtos químicos em diferentes espécies de peixes contra o *I. multifiliis*. Alguns produtos dentre os pesquisados nas últimas décadas tem sido utilizados comercialmente como o sulfato de cobre em “catfish”, ou como o dióxido de cloro com uma patente criada para o tratamento da ictiofitiríase para peixes ornamentais. Apesar da utilização comercial desses produtos após comprovada eficácia por pesquisa, ainda restam lacunas no que diz respeito às alterações na saúde dos peixes, poucos estudos relatam sobre os possíveis efeitos nos parâmetros hematológicos ou histopatológicos dos peixes durante os tratamentos quimioterápicos ou mesmo os danos causados ao meio ambiente, apesar de que o ClO_2 é ambientalmente mais amigável que os outros produtos químicos, tais como o cloro. Para uma indicação segura de um quimioterápico contra a ictiofitiríase, pesquisas que abordem os efeitos na saúde dos peixes, e efeitos contra o ectoparasita são necessárias. Diante disso, o presente trabalho visa aprofundar os conhecimentos sobre o uso de dióxido de cloro em peixes parasitados e sua possível toxicidade em peixes saudáveis.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar a eficácia do dióxido de cloro no tratamento de peixes parasitados por *Ichthyophthirius multifiliis* e efeitos na hematologia e histopatologia de *Rhamdia quelen*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a menor concentração de dióxido de cloro ClO_2 capaz de causar imobilização em terontes de *Ichthyophthirius multifiliis* em ensaio *in vitro*.

Investigar o efeito da exposição de jundiás saudáveis por 96 h ao dióxido de cloro e a relação com os parâmetros hematológicos e histopatológicos dos peixes.

Avaliar o efeito da exposição por 48 h de jundiás parasitados por *I. multifiliis* ao dióxido de cloro nas brânquias e muco dos peixes.

Avaliar o efeito de exposição por 1 h de jundiás parasitados por *I. multifiliis* ao dióxido de cloro nas brânquias e a relação com os parâmetros hematológicos dos peixes.

CAPÍTULO 2

Artigo redigido segundo normas do Journal of Environmental Science and Health, Part A

DIÓXIDO DE CLORO NO TRATAMENTO DE JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) PARASITADOS POR *Ichthyophthirius multifiliis*: HEMATOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS, FÍGADO E RIM

JESSICA NUNES DE MELO^a, SCHEILA ANELISE PEREIRA^a, EDUARDO LUIZ TAVARES GONÇALVES^a, WILSON CARNESECA JÚNIOR^b, MAURÍCIO LATERÇA MARTINS^a, JOSÉ LUIZ PEDREIRA MOURIÑO^a

^a AQUOS, Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Servidão Caminho do porto S/N, Itacorubi, Florianópolis, SC.

^b Dioxiplus Indústria e Comércio. Av. Rossi Martini, 641, Indaiatuba, SP.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo estudar a eficácia do dióxido de cloro no tratamento de peixes parasitados por *Ichthyophthirius multifiliis* e efeitos na hematologia e histopatologia de *Rhamdia quelen*. O experimento foi dividido em etapas *in vitro* e *in vivo*. O ensaio *in vitro* foi realizado para determinar a menor concentração de dióxido de cloro (ClO₂) capaz de imobilizar terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. O ensaio *in vivo* buscou conhecer os possíveis efeitos tóxicos do dióxido de cloro em jundiás saudáveis expostos por 96 horas em 10 diferentes concentrações. Ao final da exposição, foram realizadas análises hematológicas e brânquias, rim e fígado foram coletados para avaliação histopatológica. Em seguida, peixes parasitados (grau de severidade 3) por *I. multifiliis* foram expostos ao dióxido de cloro em três concentrações definidas no teste de toxicidade, para serem coletados muco e brânquias para quantificação parasitológica pós tratamento. Em outro experimento, foi determinado o efeito da exposição por 1 hora ao dióxido de cloro (25 ppm, 125 ppm, 250 ppm) em peixes parasitados por *I. multifiliis*. O dióxido de cloro foi efetivo para imobilizar terontes de *I. multifiliis* a 25 ppm de ClO₂, causando redução da infestação nas brânquias de jundiás, à exposição curta por 1 h à concentração de 125

ppm e 250 ppm e prolongada por 48 h à concentração de 25 ppm de ClO_2 . Não houve diferenças na hematologia de peixes parasitados tratados ou não com o oxidante. Alterações histopatológicas foram observadas em brânquias, fígado e rim de jundiás expostos ao dióxido de cloro, entretanto houve diferença significativa apenas em algumas das alterações observadas em relação aos não tratados. Tratamentos terapêuticos com dióxido de cloro a 25 ppm podem ser indicados para reduzir infestações causadas por *I. multifiliis* sem alterar a saúde dos peixes.

Palavras-chave: Bagre, tratamento, Protozoa, desinfetante, sanidade aquícola.

INTRODUÇÃO

Rhamdia quelen é um bagre de hábito alimentar onívoro, com ampla distribuição geográfica, desde a parte central da Argentina até o sul do México ^[1]. O cultivo desta espécie em Santa Catarina, sul do Brasil, tem sido estimulado desde 2006 pela Empresa de Pesquisa e Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI. No entanto há entraves para o estabelecimento do pacote tecnológico de cultivo desta espécie, tais como: ração de boa qualidade que atenda as exigências nutricionais, cultivo de animais monossexo, e principalmente tratamentos eficazes contra o *Ichthyophthirius multifiliis*.

O controle das infestações por *I. multifiliis* tem sido um dos principais desafios para alavancar o desenvolvimento do cultivo desta espécie ^[2]. Os prejuízos causados por essas mortalidades podem ser devastadores, ainda que no Brasil essas perdas econômicas não sejam conhecidas, elas são significativas.

Na última década têm sido realizadas pesquisas sobre esse protozoário, devido principalmente à intensificação nos cultivos que podem causar desequilíbrios nos sistemas de criação aumentando o surgimento de doenças infecciosas e/ou parasitárias ^[3]. Diversos estudos tem testado o uso de diferentes substâncias químicas no controle da ictiofitiríase em diversas espécies de peixes ^[4]. Devido ao amplo uso, são necessários estudos quanto às alterações na saúde dos peixes bem como a prevenção de riscos ao meio ambiente.

O dióxido de cloro (ClO_2) é um desinfetante oxidativo a base de cloro utilizado no tratamento de água, e de uso seguro para humanos ^[5]. Tem sido estudado intensamente com pesquisas mostrando sua ação biocida contra vírus, bactérias, algas, zooplâncton, fungos e protozoários

^[6] e para aumento da vida de prateleira de pescado pela redução da carga bacteriana ^[7]. Sua vantagem em relação a outros produtos, é que tem uso permitido como aditivo em alimentos para consumo humano pela Food and Drug Administration (FDA) ^[8].

Além de apresentar menor toxicidade comparada a produtos clorados, o dióxido de cloro apresenta maior eficiência em diversos usos e ainda gera menos resíduos tóxicos ao meio ambiente, o que tem sugerido a substituição do cloro pelo dióxido de cloro. Assim, este trabalho visa estudar a eficácia do dióxido de cloro no tratamento de peixes parasitados por *Ichthyophthirius multifiliis* e efeitos na hematologia e histopatologia de *Rhamdia quelen*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para se avaliar a eficácia de ClO₂ como desinfetante para peixes parasitados por *I. multifiliis* foram realizados estudos *in vivo* e *in vitro*. O ensaio *in vitro* de imobilização dos terontes de *I. multifiliis* foi realizado para determinar a menor concentração capaz de cessar o movimento dos parasitos (Ensaio 1). Após fase *in vitro* foram conduzidos os experimentos *in vivo* (Ensaio 2, 3 e 4) com o objetivo de determinar doses seguras para os peixes para a utilização deste agente químico.

Material biológico

Um total de 300 alevinos de *Rhamdia quelen* foram adquiridos (CEUA PP00870, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina) em piscicultura comercial no município de Pomerode/SC, transportados ao NEPAQ (Núcleo de Estudos em Patologia de Organismos Aquáticos, da Universidade Federal de Santa Catarina) e aclimatados durante três dias em tanque com volume útil de 500 L, sob aeração constante, temperatura controlada, e renovação diária de 30 % do volume de água. A água utilizada em todos os experimentos foi oriunda da rede pública de distribuição do município de Florianópolis, o cloro residual foi removido antes de sua utilização com tiosulfato de sódio a 10%, sempre verificando a neutralização do cloro com o kit Labcon CloroTest.

A alimentação dos peixes foi realizada duas vezes ao dia com ração contendo 45 % de proteína bruta *ad libitum* durante o período experimental. Parâmetros de qualidade de água foram medidos

diariamente, tais como: oxigênio dissolvido (OD) e temperatura, com oxímetro (YSI 550A, YSI Incorporated); e pH, determinado com pHmetro (YSI pH 100, EcoSense). Para obtenção do parasito *I. multifiliis*, jundiás infestados oriundos da própria piscicultura no município de Pomerode/SC foram coletados e a partir de raspados do muco epitelial foi realizada a obtenção de terontes segundo metodologia de Xu et. al.^[9]. O controle visual da infestação foi realizado com a elaboração de um protocolo para se determinar e padronizar o início dos experimentos *in vivo*.

Agente químico

O dióxido de cloro (ClO₂) utilizado em todas as etapas experimentais foi fornecido pela empresa Dioxide, apresentando a concentração de 7% do princípio ativo, sob fórmula estabilizada líquida. Para o ensaio *in vitro*, as soluções utilizadas em diferentes concentrações (10000 ppm, 5000 ppm, 2500 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm) foram preparadas diretamente por diluição em solução Tampão Fosfato 20 mM pH 7,0, para garantir a estabilidade e ação do produto.

Ensaio de imobilização de terontes de *I. multifiliis* por ClO₂

Na avaliação da capacidade de imobilização *in vitro* pelo ClO₂ contra os terontes foram utilizados 15 peixes (peso médio de 10,1 ± 4,2g e comprimento médio de 8,7 ± 5,8 cm) com sinais de parasitismo. Os peixes foram mantidos em um aquário (50x25x40 cm³) com volume de 50 L, sob aeração constante e temperatura controlada em 24 °C. A obtenção dos terontes de *I. multifiliis* foi realizada segundo a metodologia descrita por Xu et al.^[9], onde 15 peixes infestados com trofontes do parasito foram anestesiados com Eugenol 50 mg/L⁻¹ para raspagem da pele e coleta dos parasitos com auxílio de lâmina de vidro. O material coletado foi filtrado em peneira de 150 µm para retirada de pele e possíveis detritos. O filtrado foi colocado em placas de Petri (90 x 15 mm) de vidro para ocorrer à fixação dos parasitos no fundo das placas. Após 1 h a água da placa foi trocada, e os trofontes foram incubados por 18 h a 24 °C. Após a incubação, o material foi filtrado novamente em peneira de 52 µm para remoção de detritos e muco, o filtrado contendo os terontes, contados em três amostras de 1 mL na câmara de Sedgewick-Rafter em microscópio (Coleman). A concentração foi ajustada para 1.000 terontes/mL⁻¹, em seguida foram

utilizados para o ensaio de imobilização *in vitro*. O ensaio de imobilização foi realizado em microplacas de 96 poços fundo chato, 50 μL das diferentes soluções de ClO_2 foram adicionados em cada poço ^[10]. Após isso, 50 μL da solução de terontes ($1000 \text{ terontes/mL}^{-1}$) foram adicionados em todos os poços, incubando a temperatura ambiente a 25 °C por 1 h. O controle positivo foi apenas com os terontes em água e o teste realizado em triplicata. A verificação da imobilização foi por meio de observação dos parasitos nos poços da microplaca em microscópio em aumento de 40 x após 1 h.

Determinação do grau de infestação

Um protocolo de controle visual da infestação foi elaborado para os ensaios *in vivo*, sendo semelhante ao realizado por Ling ^[11] quando avaliou seus resultados de infestação em “goldfish”. Durante o experimento, alguns dos peixes adquiridos vinham da piscicultura contaminados com o protozoário, caso não recebessem algum tratamento e sofressem estresse, a infestação prosseguia exponencialmente até causar a morte dos peixes. Diante disso, foram determinados graus de infestação, visando equiparar a condição de infestação nos peixes. Jundiás com 1 a 5 pontos brancos na superfície do corpo foram considerados no grau I de infestação. Peixes com 6 a 20 pontos brancos foram considerados no grau II de infestação. Peixes com mais de 20 pontos brancos foram considerados no grau III de infestação.

Após a aquisição dos peixes, no 4º dia após aclimação, os termostatos eram desligados, adicionado gelo na água para diminuir a temperatura de 25,8° para 21 °C provocando estresse, e alterações na homeostase dos peixes. O grau de infestação foi verificado e acompanhado visualmente após dois dias do choque de temperatura, onde todos os peixes apresentavam o grau de infestação III.

Análises hematológicas

Para as análises hematológicas os peixes foram anestesiados com Eugenol 50 mg.L^{-1} até total aprofundamento anestésico, o sangue foi colhido por punção do vaso caudal, com o auxílio de seringas de 1 mL contendo anticoagulante (EDTA 10 %). O sangue destinou-se à contagem de eritrócitos totais em câmara de Neubauer, a determinação do percentual de hematócrito pelo método do microhematócrito ^[12], a contagem diferencial de células sanguíneas coradas com

Giemsa/Maygrunwald ^[13] tais extensões sanguíneas foram utilizadas para contagem de trombócitos e leucócitos ^[14].

Análises Parasitológicas

Após a coleta do sangue, os peixes foram eutanasiados por comoção cerebral para contagem de *I. multifiliis*, a superfície corporal dos peixes foi raspada, e muco e brânquias coletados e fixados em álcool 70 %. Os parasitos presentes nas amostras coletadas foram contados diretamente em estereomicroscópio.

Análise histopatológica

Um total de 6 peixes por tratamento (11 tratamentos) foram utilizados para análise histológica após anestesia profunda em Eugenol 50 mg.L⁻¹ e comoção cerebral para remoção de órgãos internos. Fragmentos de brânquias, rim posterior, fígado e pele foram coletados e fixados em formalina 10 % tamponada para observação de possíveis alterações teciduais em decorrência da exposição durante 96 h ao dióxido de cloro nas diferentes concentrações. O exame histopatológico dos órgãos foi realizado segundo a técnica histológica de rotina (inclusão em parafina), com cortes de 4 µm de espessura, e coloração padrão com hematoxilina-eosina ^[15] e posterior coloração com tricômico de Masson ^[16].

Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para averiguar a homocedasticidade. Quando os dados não se apresentavam homocedásticos, foram transformados para Log 10 e Log _(x+1). Após averiguação da homocedasticidade os dados de parâmetros hematológicos e parasitológicos foram analisados por meio de ANOVA unifatorial, com significância de 5%, e quando encontradas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas dos cortes histológicos foram realizadas por meio de tabelas de contingência estratificadas, uma para cada concentração de dióxido de cloro em cada um dos órgãos analisados. A análise estratificada teve como objetivo reduzir a influência de possíveis fatores de confusão e garantir uma análise robusta ^[17], para verificar a diferença entre cada concentração de dióxido de cloro e o controle, foram levadas em consideração as

comparações entre as alterações histopatológicas de dano para cada órgão. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa OpenEpi, versão 3, sendo utilizado o método de Mantel-Haenszel para o cálculo da razão de risco agrupada ^[18], o teste exato de Fisher ($\alpha < 0,05\%$) para comparações de associações e o teste qui-quadrado para tendência linear na avaliação das relações de dose-resposta.

Exposição prolongada de jundiás *Rhamdia quelen* saudáveis ao ClO₂ durante 96 h - Ensaio 1

Cento e dez peixes ($3,4 \pm 0,9$ g e $7,1 \pm 0,7$ cm) foram expostos a diferentes soluções de dióxido de cloro (0 ppm, 5 ppm, 15 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm, 55 ppm, 65 ppm, 75 ppm, 85 ppm, 95 ppm) durante 96 h para avaliação das variáveis hematológicas e histológicas após a exposição ao produto. A aclimação por 14 dias foi realizada para evitar o estresse pós-transporte onde os peixes foram mantidos em um tanque circular com volume útil de 500 L, sob aeração constante, temperatura controlada, e renovação diária de 30 % do volume de água, 10 peixes foram colocados em cada unidade experimental para a realização do experimento. A mortalidade foi observada diariamente e a água de cada tratamento renovada por uma solução nova de dióxido de cloro após 24, 48 e 72 h. Os peixes não foram alimentados durante o período de exposição ao dióxido de cloro ^[19]. Ao final da exposição, 6 peixes de cada tratamento foram retirados das caixas, anestesiados como descrito anteriormente e amostras de sangue coletadas por punção do vaso caudal para análises hematológicas e histológicas.

Exposição prolongada de jundiás *Rhamdia quelen* parasitados ao dióxido de cloro ClO₂ durante 48 h - Ensaio 2

Noventa e seis peixes ($11,6 \pm 2,8$ g e $11,1 \pm 0,9$ cm) parasitados por *I. multifiliis* foram expostos ao dióxido de cloro por 48 h usando três concentrações definidas no teste de toxicidade, para avaliar o efeito do oxidante ClO₂. Quando todos os peixes estavam no grau de infestação III foram distribuídos nas unidades experimentais (40 L) com as concentrações já ajustadas na água (0 ppm, 25 ppm, 35 ppm e 45 ppm). Foram utilizados 8 peixes para cada uma das três repetições. A mortalidade foi observada diariamente e a água de cada repetição renovada por uma solução correspondente a cada tratamento de dióxido de cloro após 24 e 48 h. O muco e as brânquias foram coletados de dois

peixes de cada unidade experimental após 48 h de exposição para contagem de *I. multifiliis*.

Exposição curta de jundiás *Rhamdia quelen* parasitados a dióxido de cloro ClO_2 durante 1 h - Ensaio 4

Buscando investigar o efeito de uma exposição curta de dióxido de cloro sobre a infestação de *I. multifiliis* em jundiás foi necessário testar a exposição ao produto em menor tempo e maior concentração, prática comum na piscicultura [20]. As concentrações utilizadas foram 0 ppm, 25 ppm, 125 ppm e 250 ppm, conforme resultado obtido no teste *in vitro*, sendo a última 10 vezes a concentração utilizada na exposição prolongada, de forma semelhante a outros tratamentos. Quando todos os peixes (n=72), pós choque de temperatura, estavam no grau de infestação III foram expostos as diferentes soluções de dióxido de cloro em aquários com volume de 25 L durante 1 h. Em seguida, os peixes foram devolvidos as unidades experimentais com volume útil de 40 L, sendo 6 peixes por aquário em quadruplicata. Devido ao pequeno tamanho dos peixes ($5,9 \pm 0,44$ cm e $9,07 \pm 0,18$ g), o sangue foi coletado por punção do vaso caudal em *pool* de três peixes por unidade experimental para as análises hematológicas (extensão sanguínea e contagem total de eritrócitos) e brânquias coletadas e fixadas em álcool 70 % para contagem de *I. multifiliis*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio de imobilização (*in vitro*) foi utilizado como parâmetro de provável morte dos parasitos a mobilização/imobilização dos terontes. Foi considerado resultado positivo quando todos os terontes não apresentaram movimento, negativo quando mais de 5 terontes apresentaram movimento dos 50 terontes colocados no poço. A partir de solução de 50 ppm de ClO_2 , os terontes estavam totalmente imobilizados, já na concentração 25 ppm, haviam alguns terontes com movimento e muitos imóveis, e à partir da concentração de 10 ppm, todos os terontes apresentavam movimento normal, iguais aos da concentração 0 ppm, ou seja, o produto já não estava tendo eficácia na imobilização.

A menor concentração capaz de imobilizar os terontes foi a concentração de 25 ppm de ClO_2 (devido a diluição no poço da microplaca quando adicionados os terontes). Este ensaio *in vitro* é primeiro relatado com o dióxido de cloro no mundo. Porém quando este

ensaio foi realizado com percarbonato de sódio (um forte oxidante e desinfetante) após 1 h e na concentração de 512 mg.L⁻¹ foi recordada a morte de todos os terontes [21]. Assim o dióxido de cloro causa imobilização dos terontes em menor concentração que outros produtos.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos em jundiás *Rhamdia quelen* após 96 h de exposição ao dióxido de cloro (ClO₂) nas concentrações de 0 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm.

Parâmetros/ Concentrações	0 ppm	25 ppm	35 ppm	45 ppm
Eritrócitos (x10 ⁶ / μL ⁻¹)	1,80 ± ^a	2,25 ± 8,66 ^a	1,76 ± 3,39 ^a	1,93 ± 5,82 ^a
Trombócitos (x10 ³ / μL ⁻¹)	33,5 ± 13,4 ^a	45,0 ± 37,7 ^a	10,8 ± 7,4 ^a	56,8 ± 54,2 ^a
Leucócitos (x10 ³ / μL ⁻¹)	97,5 ± 4,8 ^a	103,1 ± 2,6 ^a	102,1 ± 1,9 ^a	101,3 ± 2,3 ^a
Linfócitos (x10 ³ / μL ⁻¹)	76,8 ± 4,0 ^a	92,8 ± 1,3 ^a	89,8 ± 6,9 ^a	81,6 ± 13,3 ^a
Monócitos (x10 ³ / μL ⁻¹)	5,1 ± 1,4 ^a	1,67 ± 1,51 ^b	3,5 ± 3,7 ^a	3 ± 3,5 ^a
Neutrófilos (x10 ³ / μL ⁻¹)	10,8 ± 3,1 ^a	5,1 ± 0,9 ^b	5,0 ± 2,6 ^a	15,0 ± 11,0 ^a
LG-PAS + (x10 ³ / μL ⁻¹)	1 ± 0,8 ^a	0,1 ± 0,4 ^a	1,3 ± 1,0 ^a	0,6 ± 0,8 ^a
Leucócitos Imaturos (x10 ³ μL ⁻¹)	3,6 ± 72,7 ^a	3,3 ± 2,7 ^a	2,5 ± 2,9 ^a	1 ± 0 ^a

*letras diferentes indicam diferença pelo teste Tukey (p≤0,05) em relação aos tratamentos com ClO₂. LG-PAS + - Leucócito granular PAS – Positivo

Na análise hematológica e histológica de jundiás expostos durante 96 h a 0 ppm, 25 ppm, 35 ppm, e 45 ppm de ClO₂, não houve diferença no número de trombócitos, leucócitos, leucócitos granulares PAS-positivo, linfócitos e leucócitos imaturos. Porém houve diminuição no número de neutrófilos (p = 0,013) e monócitos (p = 0,009) nos peixes tratados com 25 ppm de dióxido de cloro em relação aos demais tratamentos (Tabela 1).

Peixes parasitados por *I. multifiliis* tem forte resposta inflamatória e aumento da atividade fagocitária na área afetada [22]. A utilização do produto em peixes não parasitados causou diminuição de células de defesa orgânica, tais como monócitos e neutrófilos.

Sugere-se que peixes infestados por *I. multifiliis* tratados com dióxido de cloro podem ter resposta inflamatória menor em comparação aos não tratados. Basófilos e eosinófilos não foram observados no sangue dos peixes analisados. Tavares-dias e Moraes [23] também

observaram esse padrão para diversas espécies de teleósteos com ausência de eosinófilos ou baixa frequência de ocorrência, variando de 0,0 a 1,1 % do percentual de leucócitos.

Tabela 2. Alterações histológicas observadas em brânquias de jundiás *Rhamdia quelen* expostos a dióxido de cloro ClO₂ a 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm e grupo controle por 96 h.

Concentração/ Alteração	0 ppm	25 ppm	35 ppm	45 ppm
FL	1 (16,7%)	3 (50%) ^{ns}	0 (0%) ^{ns}	3 (50%) ^{ns}
ESE	6 (100%)	5 (83,3%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}
HI	3 (50%)	3 (50%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}	3 (50%) ^{ns}
T	2 (33,3%)	2 (33,3%) ^{ns}	5 (83,3%) ^{ns}	3 (50%) ^{ns}
LG-PAS	5 (83,3%)	1 (16,7%) [*]	5 (83,3%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}
N	1 (16,7%)	3 (50%) ^{ns}	0 (0%) ^{ns}	4 (66,7%) ^{ns}
OL	3 (50%)	5 (83,3%) ^{ns}	5 (83,3%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}
HCM	2 (33,3%)	1 (16,7%) ^{ns}	5 (83,3%) ^{ns}	6 (100%) [*]
Total de alterações	23 (48%)	23 (48%) ^{ns}	32 (67%) ^{ns}	37 (77%) [*]

FL- Fusão Lamelar. ESE- Edema sub-epitelial. HI- Hiperplasia interlamelar. LG_PAS- presença de Leucócito granular PAS-positivo. N- Necrose. OL- Ondulação Lamelar. HCM- Hipertrofia da célula de muco. ()-Valor entre parênteses indica a ocorrência da alteração em porcentagem. *-indica diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento 0 ppm. ns - indica não haver diferença significativa (P>0,05) em relação aos não tratados.

A análise agrupada das alterações histológicas das brânquias evidenciou relação dose-resposta significativa ($p = 0.001$), sendo que os tratamentos com 35 e 45 ppm apresentaram diferenças (Tabela 2) em relação ao controle. Não houve diferença entre o tratamento 0 ppm e o de 25 ppm de dióxido de cloro, o que evidencia que a concentração de 25 ppm de ClO₂ não é causadora de lesões nos peixes expostos por até 96 h. Corroborando com as alterações observadas neste trabalho, Yonkos et. al ^[19] relatam alterações morfológicas dose-dependentes em brânquias de *Pimephales promelas* após exposição ao dióxido de cloro por apenas 12 h de exposição.

Não houve diferença na razão de risco (Tabela 5) entre a utilização de 25 ppm de ClO₂ e o controle, porém, os peixes expostos às concentrações de 35 e 45 ppm de ClO₂ tem um risco maior de apresentar

alterações histopatológicas no tecido branquial. Alterações de menor gravidade como edema sub-epitelial, hiperplasia lamelar e ondulação lamelar apresentaram elevada porcentagem de ocorrência mesmo no controle, ressaltando a sensibilidade não específica do tecido branquial a influências do ambiente e indicando um provável fator de confusão, justificando, portanto o uso da análise estratificada como recomendado por Parodi e Bottarelli ^[18].

Lesões de maior gravidade, como fusão lamelar e necrose foram menos comuns nos peixes não expostos, mas ocorreram em pelo menos metade dos peixes expostos a 25 ppm e 45 ppm de ClO₂, essas lesões provavelmente foram decorrentes de alterações primárias como hiperplasia e edema epitelial. Devido a constante exposição, não houve tempo de recuperação e a alteração progrediu até se caracterizar como lesão ^[24]. Isso ocorreu na concentração de 45 ppm de ClO₂, uma vez que os animais expostos às maiores concentrações tiveram, de forma progressiva, uma maior ocorrência de dano, demonstrando, assim, uma relação dose-resposta significativa ($p = 0,0065$).

Células do tipo leucócito granular PAS positivo são comumente observadas em jundiás e apesar de sua função celular ainda não estar totalmente elucidada, sabe-se que é um granulócito cujas características morfológicas e citoquímicas diferem dos demais leucócitos e que provavelmente está relacionado à defesa celular em infecções ^[25]. Em pargo *Sparus aurata* foram observadas células LG-PAS nas brânquias como resposta inflamatória a exposição a bifenilos policlorados ^[26]. Apenas os peixes expostos a 25 ppm de ClO₂ apresentaram menor ocorrência dessas células (Tabela 2), em relação aos não expostos, indicando que essa concentração causou uma menor inflamação branquial ($p = 0,080$). Muitas das lesões observadas nos órgãos são reversíveis, de forma que o organismo pode reparar as áreas atingidas e retornar ao seu estado de homeostase ^[27].

Nas análises agrupadas das alterações histológicas no fígado verificou-se diferença (Tabela 3) e foi possível detectar relação dose-resposta ($p = 0,006$) significativa. A análise das necroses multifocais evidenciou diferença entre os animais expostos à ClO₂ ($p = 0,00004$) e também mostrou uma relação dose-resposta positiva ($p = 0,001$). Houve diferença ainda na lesão de pontos hemorrágicos multifocais, sendo que não houve diferença nas demais alterações histológicas analisadas, indicando que de maneira geral não houve sensibilidade do fígado ao composto químico.

Tabela 3. Alterações histológicas observadas em fígados de jundiás, *Rhamdia quelen*, expostos a dióxido de cloro ClO₂ a 0 ppm, 25 ppm, 35 ppm e 45 ppm durante 96 h.

Concentração/ Alteração	0 ppm	25 ppm	35 ppm	45 ppm
NM	1 (16,7%)	4 (66,7%) ^{ns}	6 (100%) [*]	6 (100%) [*]
ILM	4 (66,7%)	3 (50%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}
CS	6 (100%)	6 (100%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}
LG-PAS	3 (50%)	3 (50%) ^{ns}	0 (0%) ^{ns}	3 (50%) ^{ns}
PHM	0 (0%)	0 (0%) ^{ns}	4 (66,7%) [*]	0 (0%) ^{ns}
EH	3 (50%)	6 (100%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}
Total de alterações	17 (47%)	22 (61%) ^{ns}	28 (78%) [*]	27 (75%) [*]

NM-Necrose multifocal. NF-Necrose focal. ILM-Infiltrado de leucócitos mononucleados. CS-Congestão dos sinusóides. LG-PAS-leucócito granular. PHM-Pontos hemorrágicos multifocais. EH-Edema dos hepatócitos. (-)-Valor entre parênteses indica a ocorrência da alteração em porcentagem. *-indica diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento 0 ppm. ns-indica não haver diferença em relação aos não tratados.

Nas concentrações de 35 e 45 ppm de ClO₂ ocorreu diferença na razão de risco (Tabela 5) para as lesões encontradas no fígado. O infiltrado de leucócitos mononucleares foi observado no fígado dos peixes de todos os tratamentos e não diferiram dos peixes não tratados. A ocorrência de infiltrações leucocitárias difere nos tratamentos 35 e 45 ppm de dióxido de cloro pode estar relacionada à necrose, semelhante ao relatado para *Astyanax* spp. coletados do rio Iguaçu (Paraná) contaminado por diversos poluentes, tais como: dioxinas, metais e pesticidas^[28].

Edema dos hepatócitos não apresentou diferença significativa de ocorrência nos peixes tratados com ClO₂ em relação aos não tratados, resposta comum a compostos com certa toxicidade, como em jundiás expostos a 700,g/L do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) durante 96 h^[29] os quais apresentaram vacuolização nos hepatócitos. Assim as alterações histológicas observadas provavelmente se devem por o fígado ser o centro para detoxificação^[30], as concentrações influenciaram o processo metabólico e consequentemente produziram as lesões observadas.

Houve necrose do tecido hepático em todos os tratamentos, com diferentes proporções. Entretanto os tratamentos 35 ppm e 45 ppm diferiram do controle, apresentando maior ocorrência dessa lesão, que é de maior gravidade e não reversível. As lesões causadas por substâncias químicas no fígado ocorrem principalmente devido a metabólitos tóxicos reativos, os quais causam lesão da membrana e lesão celular pela formação de radicais livres [31]. Peixes expostos a sedimentos de áreas poluídas também apresentam esse tipo de lesão [32], então é provável que seja uma resposta não específica a vários agentes agressores.

O rim foi também um órgão sensível às alterações na concentração de 45ppm de dióxido de cloro, de maneira que as análises agrupadas das alterações histológicas foram diferentes entre os tratamentos ($p = 0.0002$) e houve significativa relação dose-resposta positiva ($p = 0.009$).

Tabela 4. Alterações histológicas observadas em rins de jundiás *Rhamdia quelen* expostos a dióxido de cloro ClO_2 a 0 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm durante 96 h.

Concentração/ Alteração	0 ppm	25 ppm	35 ppm	45 ppm
NMET	3 (60%)	6 (100%) ^{ns}	4 (66,7%) ^{ns}	5 (100%) ^{ns}
NMGM	2 (40%)	3 (50%) ^{ns}	2 (33,3%) ^{ns}	5 (100%) ^{ns}
ECB	4 (80%)	6 (100%) ^{ns}	5 (83,3%) ^{ns}	5 (100%) ^{ns}
PHM	1 (20%)	1 (16,7%) ^{ns}	1 (16,7%) ^{ns}	5 (100%) [*]
PM	2 (40%)	3 (50%) ^{ns}	3 (50%) ^{ns}	2 (40%) ^{ns}
EP	2 (40%)	3 (50%) ^{ns}	5 (83,3%) ^{ns}	2 (40%) ^{ns}
EI	4 (80%)	5 (83,3%) ^{ns}	6 (100%) ^{ns}	5 (100%) ^{ns}
Total de alterações	18 (43%)	27 (64%) ^{ns}	26 (62%) ^{ns}	31 (74%) [*]

NMET- Necrose multifocal do epitélio tubular. NMGM- Necrose multifocal do glomérulo de Malpighi. ECB-Edema da cápsula de Bowman. PHM-Pontos hemorrágicos multifocais. PM- presença de melanomacrófagos. EP-Exsudato proteico. EI-Edema intersticial. ()-Valor entre parênteses indica a ocorrência da alteração em porcentagem. *-indica diferença estatisticamente significante em relação ao tratamento 0 ppm. ns-indica não haver diferença estatisticamente significante em relação aos não tratados.

Pontos hemorrágicos multifocais foram alterações histológicas que ocorreram com maior intensidade (Tabela 4) nos peixes expostos a 45 ppm de dióxido de cloro ($p = 0.047$).

Os peixes expostos a 45 ppm sofreram, de forma geral, mais lesões significativas em relação aos não expostos, isso evidencia que é o produto o causador de danos a saúde dos jundiás. Assim o uso desse produto deve ser utilizado com cautela a partir dessa concentração e tempo de exposição. Semelhante a quando jundiás foram expostos ao herbicida 2,4-D na água até 745 mg.L⁻¹ durante 96 h, os peixes apresentaram resistência sem grandes alterações nos peixes nas concentrações de 200 a 700 mg.L⁻¹, entretanto a partir da maior concentração, lesões já foram percebidas nos órgãos ^[33].

Sensibilidade do rim foi observada em larvas recém-eclodidas de bagre-do-canal *Ictalurus punctatus* tratadas com ácido peracético a 1,7 e 2,2 ppm por 48 h via imersão. Straus ^[34] reporta que as lesões eram de categoria moderada, sendo a principal degeneração do epitélio tubular, semelhante às encontradas nos peixes tratados com dióxido de cloro, embora as diferenças não tenham sido significativas. Entretanto o estudo foi realizado com larvas recém-eclodidas que geralmente são mais sensíveis que os alevinos utilizados no presente estudo.

Tabela 5. Razão de risco e intervalo de confiança (IC) de ocorrência das lesões em brânquias, fígado e rins de jundiás expostos ao dióxido de cloro ClO₂ a 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm durante 96 h.

	Brânquias		Fígado		Rim	
	Risco	IC 95%	Risco	IC 95%	Risco	IC 95%
25 ppm	1,091	0,729-1,632	1,294	0,9023-1,856	1,25	0,8829-1,77
35 ppm	1,391*	1,033-1,874	1,647*	1,137-2,385	1,204	0,84-1,725
45 ppm	1,609*	1,185-2,183	1,588*	1,142-2,209	1,611*	1,146-2,266

*indica diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento 0 ppm.

Não houve diferença significativa na razão de risco para os rins dos peixes expostos a concentrações de 25 ppm e 35 ppm, porém, na concentração de 45 ppm o risco foi significativamente maior (Tabela 5).

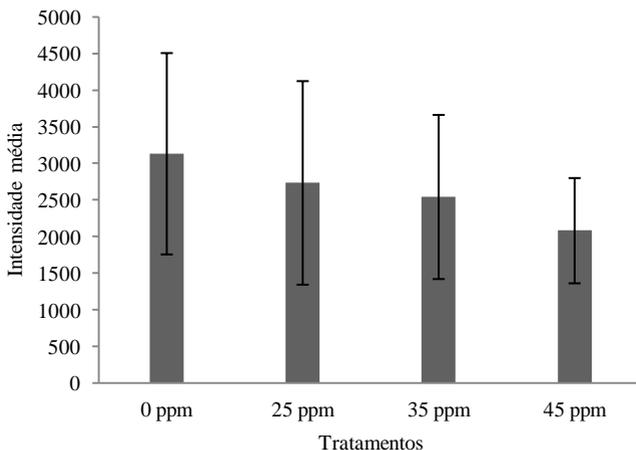
Exposição prolongada de jundiás *Rhamdia quelen* parasitados por *I. multifiliis* ao dióxido de cloro (ClO₂) durante 48 h

Os parâmetros de qualidade da água durante a exposição prolongada não diferiram significativamente, a um nível de 5% de confiança, entre os grupos testados, com taxa de oxigênio dissolvido em

$7,34 \pm 0,30 \text{ mg/L}^{-1}$, pH em $7,28 \pm 0,05$ e temperatura em $24,6 \pm 0,38$ °C, isso é adequado para a espécie de acordo com Braun et. al. ^[35].

Os peixes coletados após 48 h de exposição tinham peso e comprimento médio de $11,6 \pm 2,89 \text{ g}$ e $11,1 \pm 0,99 \text{ cm}$ respectivamente, e não houve diferença entre o peso dos peixes ($p = 0,295$), apenas no comprimento dos peixes tratados com 250 ppm de ClO_2 ($p = 0,037$) em relação aos peixes dos outros tratamentos, no entanto como esse foi o mais efetivo contra o parasito nas brânquias, e não houve diferença no muco de peixes tratados e não tratados afirma-se que a diferença no comprimento não causou alteração no número de *I. multifiliis*.

Figura 1. Contagem de *Ichthyophthirius multifiliis* no muco de jundiás, *Rhamdia quelen*, tratados com dióxido de cloro ClO_2 a 0 ppm, 25 ppm, 35 ppm e 45 ppm por 48 h.

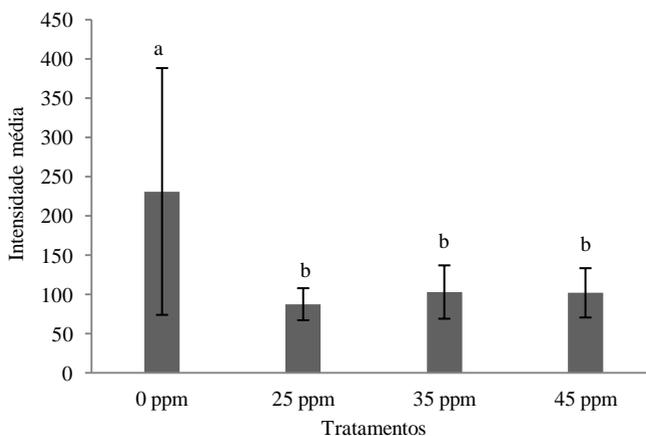


A contagem de *I. multifiliis* no muco mostrou que a infestação foi realmente muito alta com intensidade média de $2624,6 \pm 1167,9$ trofontes, mas não houve diferença entre os tratados e não tratados ($p = 0,499$), o dióxido de cloro não diminuiu a infestação no tegumento dos peixes. Borba et. al ^[36] relataram infestação menor com intensidade média de $394,6 \pm 130,5$ em jundiás com peso semelhantes ($18,81 \pm 2,76 \text{ g}$). Em peixes tratados com sal (NaCl) a 1%, sal e Formol 250 mg.L^{-1} também não houve eficácia desses tratamentos na redução de *I. multifiliis* no muco de surubins ^[37]. Porém Klein et. al ^[4] mostraram

redução de aproximadamente 50 % da infestação por *I. multifiliis* em todos os tratamentos, entre inoculações por 7 dias e banhos de 1 hora com diversas substâncias químicas utilizadas para tratar peixes parasitados.

A infestação de *I. multifiliis* nas brânquias resultou em diferenças entre o tratamento de 0 ppm e o com dióxido de cloro a 25 ppm, 35 ppm e 45 ppm como mostrado na Figura 2. As concentrações testadas causaram redução de até 62 % (25 ppm de ClO_2) da infestação. Entretanto não houve diferença entre os três tratamentos, o que indica que pode ser indicada a menor concentração, 25 ppm de dióxido de cloro, visando menor custo de aplicação e menores danos aos tecidos dos peixes.

Figura 2. Contagem de *Ichthyophthirius multifiliis* nas brânquias de jundiás, *Rhamdia quelen*, tratados com dióxido de cloro ClO_2 a 0 ppm, 25 ppm, 35 ppm e 45 ppm por 48 h. ^{a,b} letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey $p=0,002$.

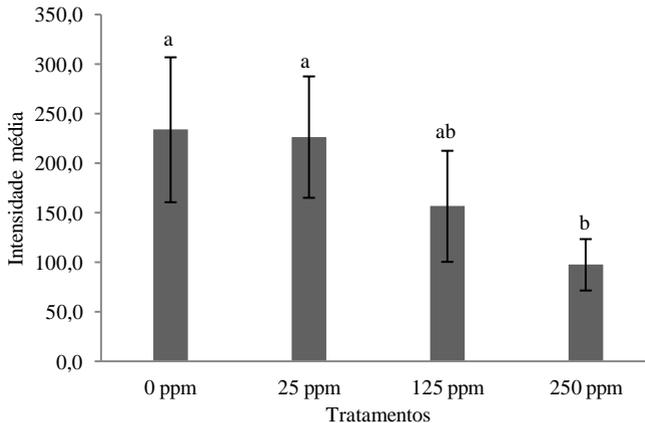


Esse resultado foi semelhante ao obtido por Klein et. al. [4], em alevinos de surubim do Iguaçu *Steindachneridion* sp parasitados por *I. multifiliis* quando submetidos a inoculações e banhos com diversos produtos químicos comumente utilizados na aquicultura, e a maior redução de infestação (49,5 %) foi na inoculação de formol 25 mg.L⁻¹ na água por sete dias seguida por 47, 2 % de redução na infestação por formol 250 mg.L⁻¹ em banhos de 1 hora.

Exposição curta de jundiás *Rhamdia quelen* parasitados por *Ichthyophthirius multifiliis* ao dióxido de cloro ClO_2 por 1 hora

A infestação por *I. multifiliis* nas brânquias mostrou diminuição no número de parasitos nos peixes expostos por 1 hora (Figura 2). Os peixes não tratados com ClO_2 tinham uma média de infestação de aproximadamente $234 \pm 73,1$ trofontes. Já nos tratamentos com o produto, a infestação diminuiu com o aumento da concentração do produto, apresentado uma relação inversamente proporcional. Sendo que o tratamento com 250 ppm de dióxido de cloro durante 1 hora mostrou maior eficácia, reduzindo mais que 50 % da infestação.

Figura 3. *Ichthyophthirius multifiliis* nas brânquias de jundiás *Rhamdia quelen* após banhos de 1 hora com dióxido de cloro (ClO_2) nos tratamentos 0 ppm, 25 ppm, 125 ppm e 250 ppm. ^{a,b} - indica diferença significativa no teste de Tukey ($p=0,001$)



Resultados satisfatórios semelhantes foram encontrados por Yamabe e Yoshida ^[38] na redução da infestação nos peixes tratados a 5 ppm, e controle da infestação por *I. multifiliis* em “goldfish” na concentração de 15 e 30 ppm de ClO_2 , atingido a cura dos peixes após 7 dias de tratamento, entretanto estes autores não testaram uma exposição curta dos peixes parasitados ao químico.

Análise hematológica de jundiás parasitados por *Ichthyophthirius multifiliis* quando expostos ao dióxido de cloro (ClO_2) a 0 ppm, 25 ppm, 125 ppm e 250 ppm por 1 hora

Não houve diferença ($p < 0,05$) na contagem total de eritrócitos e hematócrito entre os tratamentos com dióxido de cloro. Na contagem diferencial de células sanguíneas, não houve diferença para trombócitos ($p= 0,47612$), monócitos ($p= 0,761$), linfócitos ($p= 0,485$) e neutrófilos ($p=0,857$) (Tabela 6). Basófilos foram observados em baixos níveis, e eosinófilos não foram observadas no sangue dos peixes analisados, porém isso está de acordo com outros resultados [22].

Apesar de não haver diferenças entre os tratamentos aplicados, o quadro hematológico dos peixes sugere que eles estavam anêmicos, com baixo percentual de hematócrito (Tabela 6) e menor quantidade de eritrócitos do que $1,95 \pm 0,40 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, o reportado por Tavares-dias et. al., [39] provavelmente devido à parasitose e não devido ao uso do dióxido de cloro.

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos em jundiás *Rhamdia quelen* parasitados por *I. multifiliis* após 1 h ao dióxido de cloro (ClO_2) nas concentrações de 0 ppm, 25 ppm, 125 ppm e 250 ppm por 1 h.

Parâmetros	Concentrações			
	0 ppm	25 ppm	125 ppm	250 ppm
Hematócrito (%)	17,5 ^a	10 ^a	12 ^a	9,5 ^a
Eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	$1,12 \pm 0,79^a$	$1,1 \pm 0,46^a$	$1,13 \pm 0,35^a$	$1,28 \pm 0,39^a$
Trombócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	$241 \pm 2,0^a$	$24,0 \pm 12,0^a$	$17,2 \pm 19,2^a$	$14 \pm 6,5^a$
Leucócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	$102,7 \pm 4,5^a$	$102,8 \pm 4,5^a$	$107,2 \pm 2,5^a$	$104,3 \pm 3,5^a$
Linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	$61,7 \pm 18,0^a$	$61,8 \pm 18,0^a$	$66 \pm 16,9^a$	$81,3 \pm 8,9^a$
Monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	$25,2 \pm 14,1^a$	$25,3 \pm 14,2^a$	$14,2 \pm 8,0^a$	$10,3 \pm 4,0^a$
Neutrófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	$12,7 \pm 12,1^a$	$12,8 \pm 12,1^a$	$17,2 \pm 9,9^a$	$9 \pm 5,2^a$
LG-PAS + ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	$2,5 \pm 4,3^a$	$2,5 \pm 4,4^a$	$4 \pm 7,3^a$	0 ^a
Leucócitos Imaturos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	0 ^a	0 ^a	$4 \pm 2,1^a$	$3,6 \pm 3,0^a$
Basófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	$0,5 \pm 1^a$	$0,5 \pm 1,0^a$	$1,7 \pm 0,5^a$	0 ^a

LG-PAS + - Leucócito granulas PAS – Positivo. ^a-indica não haver diferença significativa

O tempo de exposição ao produto foi de apenas 1 hora, certamente foi pouco para causar mudanças no quadro hematológico dos peixes. Entretanto Moore e Calabrese [40] testando longa exposição reportaram que após 30 dias de administração de dióxido de cloro

através da água não houve alterações em 11 parâmetros hematológicos dos ratos expostos. Resultados de Schalch et al.^[41] mostram que banhos com diflubenzuron em pacus foram eficazes contra o *Dolops carvalhoi* e ainda causaram aumento trombocitário e eritrócitário. Em contraste a isso Tavares-Dias et al.^[42] relataram que banhos com sulfato de cobre (CuSO_4) causaram leucopenia e eritrocitopenia em tambaquis parasitados.

A qualidade da água durante a exposição curta também não apresentou diferença entre tratamentos ($p > 0,05$), com taxa média de oxigênio dissolvido em $7,98 \pm 0,38 \text{ mg.L}^{-1}$, pH $7,17 \pm 0,17$, e temperatura em $24,82 \pm 0,79 \text{ }^\circ\text{C}$.

CONCLUSÕES

O dióxido de cloro se mostrou efetivo para imobilizar terontes de *Ichthyophthirius multifiliis* na menor concentração de 25 ppm de ClO_2 *in vitro*. Nessa mesma concentração em exposição prolongada durante 48 h reduz mais que 50 % a infestação por *I. multifiliis* nas brânquias de jundiás. Após exposição curta durante 1 h, o ClO_2 reduz até 62 % a infestação por *I. multifiliis* nas brânquias nas concentrações de 125 ppm e 250 ppm de ClO_2 . Quanto à hematologia dos peixes, poucas alterações foram significativas nos peixes parasitados tratados ou não com o oxidante. Alterações histológicas foram observadas em brânquias, fígado e rim de jundiás expostos ao dióxido de cloro, no geral as lesões foram de gravidade leve a moderada e muitas das alterações não tiveram diferenças em relação aos não tratados. É possível propor um tratamento com dióxido de cloro a 25 ppm por até 48 h que reduz mais de 50 % da infestação por *I. multifiliis*, sem prejudicar a saúde dos jundiás. Recomenda-se para futuros trabalhos na área, iniciar a experimentação com peixes parasitados no grau de infestação II, pois a evolução da doença é exponencial, causando rapidamente a morte de todos os peixes.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer as instituições financiadoras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado a J.N.Melo, a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a empresa Dioxide pelo suporte financeiro para realização do trabalho, e a Patrícia Garcia pelo treinamento em técnicas histológicas.

REFERÊNCIAS

- [1] Silfvergrip, A.M.C. A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History; Stockholm, Sweden, 1996, 156.
- [2] Shoemaker, C.A.K.; P. K. H. Keeping Aquaculture Fish Healthy. Agricultural Research Report 58; U.S. Department of Agriculture: Beltsville, MD, 2010; 11-13.
- [3] Martins, M., Moraes, F., Fujimoto, R., Onaka, E., Nomura, D., Silva, C. and Schalch, S. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes a survey of diagnosticated cases from 1993 to 1998. Rev. Bras. Parasitol. Vet. **2000**, 9 (1), 23-28.
- [4] Klein, S.; Feiden, A.; Boscolo, W. R.; Reidel, A.; Signor, A.; Signor, A. A. Utilização de produtos químicos no controle de *Ichthyophthirius multifiliis*, Fouquet (1876) em alevinos de surubim do Iguaçu *Steindachneridion* sp., Garavello (1991). Semina Ciên. Agr. **2004**, 25 (1), 51-58.
- [5] Berg, J.D.; Aieta, E.M.; Roberts, P.V. Comparison of viral and bacterial indicators of disinfection in wastewater with chlorine dioxide and chlorine. Wat. Chl.: Environ. Imp. and Heal. Effec. **1980**, 3, 7-11.
- [6] Junli, H.; Li, W.; Nenqi, R.; Li, L.X.; Fun, S.R.; Guanle, Y. Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. Wat. Res. **1997**, 31, 455-460.
- [7] Kim, J.; Huang, T.S.; Marshall, M.; Wei, C.I. Chlorine dioxide treatment of seafoods to reduce bacterial loads. J. Food Sci. **1999**, 64, 1089-1093.
- [8] Food, U. and Administration, D. CFR-code of federal regulations title 21. Current good manufacturing practice for finished pharmaceuticals Part. **1999**, 211.

- [9] Xu, D., Klesius, P.; Shoemaker, C. Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. Fish Shellf. Immun. **2009**, *26*, 614.
- [10] Martins, M.L.; Xu, D.H.; Shoemaker, C.A.; Klesius, P.H. Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. Fish Shellf. Immun. **2011**, *31* (6), 774-780.
- [11] Ling, F.; Wang, J.G.; Liu, Q.F.; Li, M.; Ye, L.T.; Gong, X.N. Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in goldfish (*Carassius auratus*) by potassium ferrate (VI) treatment. Veter. Parasit. **2010**, *168* (3), 212-216.
- [12] Goldenfarb, P.; Bowyer, F. P.; Hall, E.; Brosious, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. Americ. J. of Clinic. Pathol. **1971**, *56* (1), 35-39.
- [13] Rosenfeld, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. Mem do Instit. Butantan, **1947**, *20*, 329-334.
- [14] Ishikawa, A.; Ranzani-Paiva, M.; Lombardi, J. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. Arc. of Veter. Scien. **2008**, *13* (1), 54-63.
- [15] Luna, L.G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. **1968**, *3*, 32-38.
- [16] Michalany, J. Técnica histológica em anatomia patológica. Técnica histológica em anatomia patológica com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico, 2ed; Ed. Michalany: São Paulo; 1990, 40-112.
- [17] Davis, C.S. Statistical analysis of stratified 2x2 tables. Inf. Cont.and Hosp. Epidem. **1991**, *12*, 173-178.
- [18] Stefano, P.; Ezio, B. The Mantel-Haenszel procedure in epidemiological studies: an introduction. Ann. Fac. Med. Vet. Parma. **2007**, *27*, 17-32.
- [19] Yonkos, L.T.; Fisher, D.J.; Wright, D.A.; Kane, A.S. Pathology of fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to chlorine dioxide and chlorite. Mar Environ Res, **2000**, *50*, 267-271.
- [20] Pavanelli, G.C.; Eiras, J.d.C.; Takemoto, R.M. Protozoa. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento, 2ed; Eduem: Maringá, 2002; vol. 2, 305.

- [21] Heinecke, R.D.; Buchmann, K. Control of *Ichthyophthirius multifiliis* using a combination of water filtration and sodium percarbonate: Dose-response studies. *Aquaculture*, **2009**, *288*, 32-35.
- [22] Ventura, M.; Paperna, I. Histopathology of *Ichthyophthirius multifiliis* infections in fishes. *J Fish Biol*, **1985**, *27*, 185-203.
- [23] Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. Principais características hematológicas. *Hematologia de peixes teleósteos*, 1ed; M. Tavares-Dias; Ribeirão Preto, 2004, vol. 1, 144.
- [24] Bernet, D.; Schmidt, H.; Meier, W.; Burkhardt-Holm, P.; Wahli, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis*, **1999**, *22*, 25-34.
- [25] Tavares-Dias, M.; Mataqueiro, M.I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. *Acta Scient., Biol. Sci.* **2004**, *26*, 157-62.
- [26] Lauriano, E.R.; Calò, M.; Silvestri, G.; Zaccone, D.; Pergolizzi, S.; Cascio, P.L. Mast cells in the intestine and gills of the sea bream, *Sparus aurata*, exposed to a polychlorinated biphenyl, PCB 126. *Acta Histochem.* **2012**, *114*, 166-171.
- [27] Vieira, V.A.R.O. Avaliação da toxicidade de metais no metabolismo de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae). (Tese de Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- [28] Silva, J.C.d. Biomarcadores morfológicos e análise química da bile em peixes para avaliação da qualidade da água do Rio Iguaçu. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- [29] Cattaneo, R.; Loro, V.; Spanevello, R.; Silveira, F.; Luz, L.; Miron, D.; Fonseca, M.; Moraes, B.; Clasen, B. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) herbicide. *Pestic. biochem. and Phys.* **2008**, *3*, 133-137.
- [30] Williams, P.L.; James, R.C.; Roberts, S.M. Principles of toxicology environmental and industrial applications; 2ed. John Wiley & Sons: New York, 2003, 575.
- [31] Kumar, V. Robbins & Cotran. Patologia: Bases Patológicas das Doenças, 8ed. Elsevier Brasil, Rio de Janeiro, 2011, 1504.
- [32] Meletti, P.C., Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas

- em peixes. Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu. Rima Editora: São Carlos, 2003, 149-180.
- [33] Cattaneo, R., Parâmetros metabólicos e histológicos de jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos à formulação comercial do herbicida 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D). (Tese de doutorado) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- [34] Straus, D.L.; Meinelt, T.; Farmer, B.D.; Beck, B.H. Acute toxicity and histopathology of channel catfish fry exposed to peracetic acid. *Aquaculture*, **2012**, *342*, 134-138.
- [35] Braun, N.; De Lima, R.L.; Moraes, B.; Loro, V.L.; Baldisserotto, B. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. *Aquac. Res.* **2006**, *37*, 1524-1531.
- [36] Borba, M.R.d.; Fracalossi, D.M.; Freitas, F.A.; Efeito da suplementação de vitamina C na dieta sobre asusceptibilidade de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*, ao *Ichthyophthirius multifiliis*. *Acta Scient. Anim. Scienc.* **2007**, *29*, 93-99.
- [37] Rodrigues, R.A. Uso do sal comum no controle de *Ichthyophthirius multifiliis* em juvenis de *Pseudoplatystoma* spp. Anais Do Encontro De Iniciação Científica (Enic), Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, vol 1 (3), 2011. Mato Grosso do Sul,
- [38] Yamabe, A.; Yoshida, R. Curative and preventive method for aquarium fish. U.S. Patent 4,946,690, Ago 7, 1990.
- [39] Tavares-Dias, M.; Melo, J.F.B.; Moraes, G.; Moraes, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros: IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciênc. Rur.* **2002**, *32*, 693-698.
- [40] Moore, G.; Calabrese, E. The effects of chlorine dioxide and sodium chlorite on erythrocytes of A/J and C57L/J mice. *J. of environ. Path. and toxic.*, **1980**, *4*, 513-524.
- [41] Shalch, S.H.C.; Belo, M.A.A.; Soares, V.E.; Moraes, J.R.E.; Moraes, F.R. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. *Acta Scient. Anim. Scien.* **2008**, *27*, 297-302.
- [42] Tavares-dias, M.; Ferreira, J.S.; Affonso, E.G.; Ono, E.A.; Martins, M.L. Toxicity and effects of copper sulfate on parasitic control and hematological response of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Bol. Instit. de Pesca*, **2011**, *37*, 355-365.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ALTINOK, I. Toxicity and therapeutic effects of chloramine-T for treating *Flavobacterium columnare* infection of goldfish. **Aquaculture**, v. 239, n. 1-4, p. 47-56, Sep 30 2004.

AMARAL-JÚNIOR, H. G., S. **O jundiá *Rhamdia quelen* - relatos de avanços no cultivo do peixe de água doce mais promissor da região sul do Brasil**. 1. Camboriú, SC.: EPAGRI/CNPQ/MPA/FAPESC, 2013. 106 ISBN 978-85-915537-0-9.

BALDISSEROTO, B.; RADÜNZ, N. J. Criação de Jundiá. **Santa Maria: UFSM**, 2004.

BALDISSEROTTO; GOMES, L. D. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2. Santa Maria: UFSM, 2010. 608 ISBN 857391064X.

BALDISSEROTTO, B. **Criação de jundiá**. Ed. UFSM, 2004. ISBN 8573910518.

BARCELLOS, L. J. F., M. FERREIRA, D. **Workshop sobre jundiá: História e Perspectivas**. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, 2013. ISBN 978-857515-483-0.

BERG, J. D. et al. Comparison of viral and bacterial indicators of disinfection in wastewater with chlorine dioxide and chlorine. **Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects**, v. 3, p. 711, 1980.

BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization, and preservation**. Lippincott Williams & Wilkins, 2001. ISBN 0683307401.

BOEGER, W. A. et al. Histopathology as an approach to evaluate the effect of an oil spill on fishes of the Arroio Saldanha and Rio Iguacu (Brazil). International Oil Spill Conference, 2003. American Petroleum Institute. p.955-961.

BOWKER, J. D. et al. Chloramine-T Margin-of-Safety Estimates for Fry, Fingerling, and Juvenile Rainbow Trout. **North American Journal of Aquaculture**, v. 73, n. 3, p. 259-269, 2011.

BRASIL, M. D. P. E. A. D. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. p. 60, 2011 2011.

BRAUN, N. et al. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 15, p. 1524-1531, 2006.

BRUM, A. et al. *Hematological and histopathological changes in silver catfish Rhamdia quelen* (Siluriformes) exposed to clomazone herbicide in the Madre River, Santa Catarina State, Southern Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 49, n. 3, p. 169-175, 2014.

BULLOCK, G. et al. Hatchery efficacy trials with chloramine-T for control of bacterial gill disease. **Journal of aquatic animal health**, v. 3, n. 1, p. 48-50, 1991.

CARNEIRO, P. C. F. et al. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 1, p. 99-102, 2005.

CENGIZ, E. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 200-204, 2006.

COYNE, R. S. et al. Comparative genomics of the pathogenic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*, its free-living relatives and a host species provide insights into adoption of a parasitic lifestyle and prospects for disease control. **Genome biology**, v. 12, n. 10, p. R100, 2011.

DICKERSON, H. W. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). **Fish diseases and disorders**, v. 1, p. 116-153, 2006.

DONNELLY, J. K.; STENTIFORD, E. I. The Cryptosporidium problem in water and food supplies. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 30, n. 2, p. 111-120, 1997.

EIRAS, J. D. C. **Elementos de ictioparasitologia**. 1994. ISBN 9729194769.

ELSAYED, E. E. et al. An investigational approach to an outbreak of Ichthyophthiriasis in two ornamental fish species. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 26, n. 5, p. 211-216, 2006.

FAO-FIGIS. 2014. Disponível em: <
http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_8955052436720146491.xml&outtype=html >.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. **FAO, Food Agriculture Organization of the United Nations**. , p. 209, 2012.

_____. Fisheries Global Information System (FIGIS). **FAO, Food Agriculture Organization of the United Nations. World Wide Web electronic database. 2013** . 2013.

FINCH, G. R.; LI, H. B. Inactivation of *Cryptosporidium* at 1 degrees C using ozone or chlorine dioxide. **Ozone-Science & Engineering**, v. 21, n. 5, p. 477-486, Oct 1999.

FRACALOSSO, D. M. et al. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 3, p. 345-352, 2004.

GOMES, L. D. C. et al. Biology of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pemelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

HASHIMOTO, G. S. D. O. Nova espécie de Trichodina Ehrenberg, 1830 (Ciliophora: Trichodinidae) encontrada em *Rhamdia quelen* (Siluriforme: Heptapteridae), Santa Catarina, Brasil. 2012.

HEINECKE, R. D.; BUCHMANN, K. Control of *Ichthyophthirius multifiliis* using a combination of water filtration and sodium percarbonate: Dose-response studies. **Aquaculture**, v. 288, n. 1-2, p. 32-35, Mar 2 2009.

HUANG, J. et al. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. **Water Research**, v. 31, n. 3, p. 607-613, 1997.

ISHIKAWA, A.; RANZANI-PAIVA, M.; LOMBARDI, J. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. *Arc. of Veter. Scien.* **2008**, *13* (1), 54-63.

JUNLI, H. et al. Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. **Water Research**, v. 31, n. 3, p. 455-460, 1997.

KARAN, V. et al. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 40, n. 1, p. 49-55, 1998.

KIM, J. et al. Chlorine dioxide treatment of seafoods to reduce bacterial loads. **Journal of food science**, v. 64, n. 6, p. 1089-1093, 1999.

KIM, S. R. et al. Antimicrobial Effects of Chemical Disinfectants on Fish Pathogenic Bacteria. **Food Science and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 971-975, Oct 2008.

KLEIN, S. et al. Utilização de produtos químicos no controle de *Ichthyophthirius multifiliis*, Fouquet (1876) em alevinos de surubim do Iguçu *Steindachneridion* sp., Garavello (1991). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 1, p. 51-58, 2004.

KORICH, D. G. et al. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1423-1428, 1990.

LECHEVALLIER, M. W.; AU, K. K. **Water treatment and pathogen control: Process efficiency in achieving safe drinking-water**. IWA Publishing, 2004. ISBN 1843390698.

LIMA, R. L. D. INCLUSÃO DE SAL NA RAÇÃO E A TOXICIDADE DO NITRITO EM ALEVINOS DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen*. **Dissertação de mestrado**, 2005.

LOPES, J.; SILVA, L. Influência do pH da água na sobrevivência e crescimento de larvas de jundiá *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824, PISCES, PIMELODIDAE) em duas épocas de desovas. **Santa Maria-RS**, 1998.

LUQUE, J. L. *Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria*, v. 13, n. Supl 1, p. 161-165, 2004.

MABILIA, R. G.; SOUZA, S. M. G. D. Efeito do tratamento com diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas-DOI: 10.4025/actascibiolsoci. v28i2. 1040. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 159-163, 2008.

MADSEN, H. C. et al. *Trichodina* sp.(Ciliophora: Peritrichida) in eel *Anguilla anguilla* in recirculation systems in Denmark: host-parasite relations. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 42, n. 2, p. 149-152, 2000.

MARCHIORO, M. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Pimelodidae) à variação de pH e salinidade da água de cultivo. **Santa Maria, RS**, 1997.

MARTINS, M. L. et al. Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 6, p. 774-780, Dec 2011.

MATTHEWS, R. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and Ichthyophthiriosis in Freshwater Teleosts. **Advances in Parasitology**, v. 59, p. 159, 2005.

NOGA, E. J. **Fish disease: diagnosis and treatment**. John Wiley & Sons, 2010. ISBN 0813821290.

OLSEN, O. Animal parasites. Their life cycles and ecology. **Animal parasites. Their life cycles and ecology. 3rd edition.**, 1974.

ORTEGA, Y. R. et al. Efficacy of Gaseous Chlorine Dioxide as a Sanitizer against *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, and *Encephalitozoon intestinalis* on Produce. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 12, p. 2410-2414, Dec 2008.

OSTLAND, V. E. et al. Comparison of formalin and chloramine-T for control of a mixed gill infection (bacterial gill disease and

ichthyobodiasis) in rainbow trout. **Journal of aquatic animal health**, v. 7, n. 2, p. 118-123, 1995.

PÁDUA, S. B. D. M. F., R. N. DE; DIAS NETO, J.; JERÔNIMO, G. T.; ISHIKAWA, M. M.; MARTINS, M. L. **Ictiofitiríase: conhecendo a doença para elaborar estratégias de controle**. Panorama da Aquicultura. Rio de Janeiro. 22: p. 22-31 p. 2012.

PILCHOWSKI, R. W. Avaliação dos impactos de derramamento de óleo sobre a ictiofauna do altíssimo, alto e médio Rio Iguaçu, Paraná, Brasil. 2012.

RAISSY, M.; ANSARI, M. Histopathological changes in the gills of naturally-infected *Capoeta aculeata* (Cuvier and Valenciennes, 1844) with parasites. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 68, p. 15422-15425, Nov 2 2011.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. R. et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1. Maringá: Eduem - Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2013. 140 ISBN 978-85-7628-530-4.

ROSENBLATT, D. Chlorine dioxide: chemical and physical properties. **Ozone/Chlorine Dioxide Oxidation Product of Organic Materials**, RG Rice and JA Cotruno, eds, Ozone Press International, Cleveland, OH, p. 332-343, 1978.

ROTTA, M. **Boas práticas de manejo (BPMs) para a produção de peixes em tanques-redes**. Embrapa Pantanal, 2003.

ROWLAND, S. J. et al. Use of formalin and copper to control ichthyophthiriosis in the Australian freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). **Aquaculture Research**, v. 40, n. 1, p. 44-54, Dec 22 2008.

SCHULZ, U.; LEUCHTENBERGER, C. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2A, p. 565-574, 2006.

SCIENCEDIRECT. All Sources Search. 14/02/14 2014.

SHOEMAKER, C. A. K., P. H. **Keeping Aquaculture Fish Healthy**. Agricultural Research. Beltsville, Maryland, United States Department of Agriculture. 58, 11-13, 2010.

- SILFVERGRIP, A. M. **A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Department of Zoology. University of Stockholm, 1996. ISBN 9171534431.
- SMAIL, D. A. et al. Disinfectants against cultured Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus: the virucidal effect of three iodophors, chloramine T, chlorine dioxide and peracetic acid/hydrogen peroxide/acetic acid mixture. **Aquaculture**, v. 240, n. 1-4, p. 29-38, Oct 27 2004.
- SMITH, C. E.; PIPER, R. G. Pathological effects in formalin-treated rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 29, n. 3, p. 328-329, 1972.
- SOLOMON, K. R. Chlorine in the bleaching of pulp and paper. **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 1721-1730, Sep 1996.
- SORTKJÆR, O. et al. **Optimering af behandlingseffekten i akvakultur. Minimering af forbrug og udledning af hjælpestoffer**. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. 2008. (8770730334)
- SRIVASTAVA, S. et al. Toxicological effects of malachite green. **Aquatic Toxicology**, v. 66, n. 3, p. 319-329, Feb 25 2004.
- STENTIFORD, G. et al. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 55, n. 2, p. 137-159, 2003.
- STRAUS, D. L. Comparison of copper sulfate concentrations to control ichthyophthiriasis in fingerling channel catfish. **Journal of applied aquaculture**, v. 20, n. 4, p. 272-284, 2008.
- STRAUS, D. L. et al. Acute toxicity and histopathology of channel catfish fry exposed to peracetic acid. **Aquaculture**, v. 342, p. 134-138, Apr 15 2012.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Toxicity and effects of copper sulfate on parasitic control and hematological response of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Boletim Instituto de Pesca, São Paulo**, v. 37, n. 4, p. 355-365, 2011.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Haematological changes in *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. **Bol Inst Pesca**, v. 28, n. 1, p. 9, 2002.

VARGAS, R. J. et al. Physiological response of experimental challenge of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard, 1824) fingerlings rather fed with different lipid sources. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 81-86, Apr-Jun 2008.

VENANCIO, A. C. P. et al. Metazoan parasites of Mandi-amarelo *Pimelodus maculatus* and of Jundiá *Rhamdia quelen* (Osteichthyes: Siluriformes) of Paraíba do Sul River, Volta Redonda, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 157-163, 2010.

WEISS, L. A. Influência da amônia e do oxigênio dissolvido na sobrevivência dos juvenis diplóides e triplóides de jundiá *Rhamdia quelen* Quoy. 2012.

WURSTBAUGH, W. A.; TAPIA, R. A. Mass mortality of fishes in lake Titicaca (Peru–Bolivia) associated with the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Transactions of the American fisheries society**, v. 117, n. 2, p. 213-217, 1988.

XU, D. H. et al. Parasitism by protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* enhanced invasion of *Aeromonas hydrophila* in tissues of channel catfish. **Vet Parasitol**, v. 184, n. 2-4, p. 101-7, Mar 23 2012.

YAMABE, A.; YOSHIDA, R. **Curative and preventive method for aquarium fish**: U.S. Patent 4,946,690, Ago 7, 1990.

YONKOS, L. T. et al. Pathology of fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to chlorine dioxide and chlorite. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1-5, p. 267-271, Jul-Dec 2000.

YU, H. et al. Histopathological study of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) experimentally infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 14, p. 3539-3544, Apr 16 2012.

ZANIBONI-FILHO, E. et al. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo: TecArt, p. 45-74, 2004.