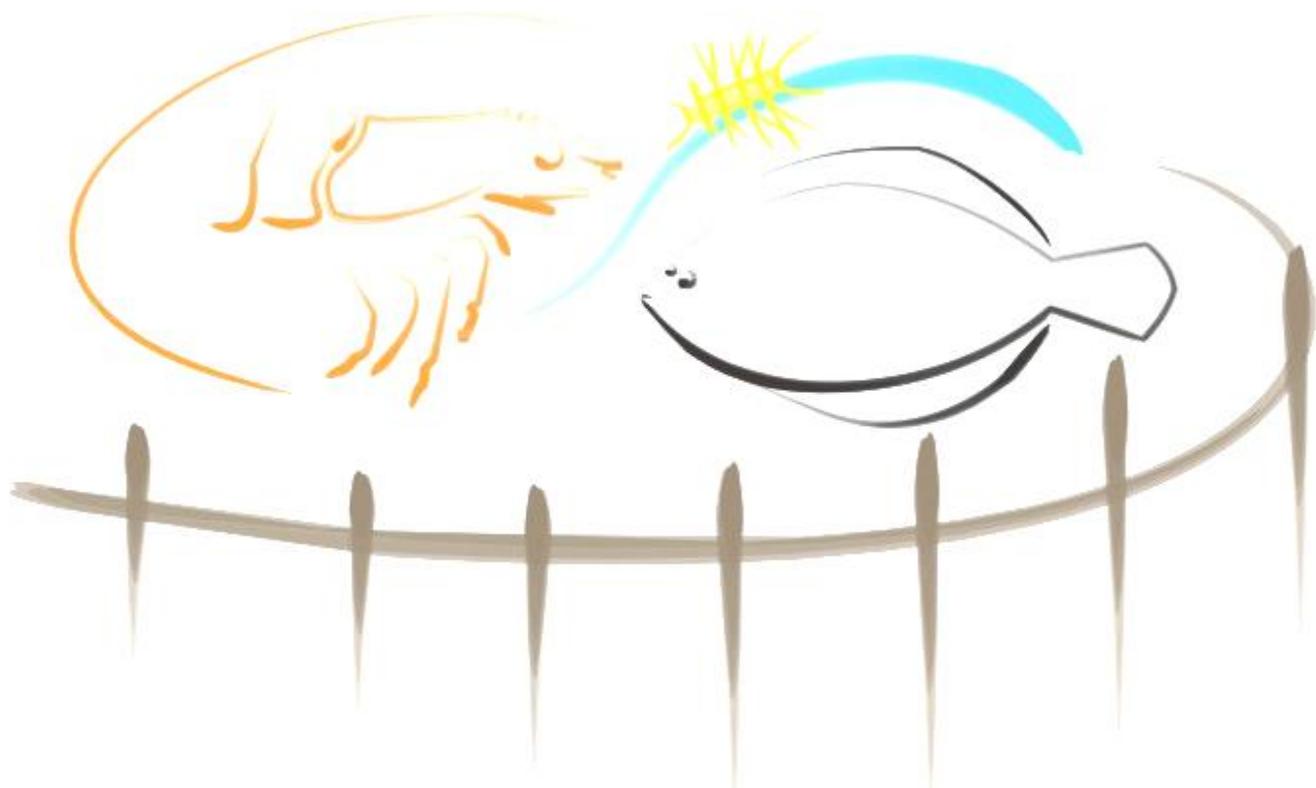




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ALHO MODULA POSITIVAMENTE O
SISTEMA IMUNOLÓGICO E A MORFOLOGIA INTESTINAL DE JUVENIS
DO BIJUPIRÁ *Rachycentron canadum***

Victor Santos Lira da Nóbrega

RIO GRANDE-RS
2018

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Oceanografia
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ALHO MODULA POSITIVAMENTE O
SISTEMA IMUNOLÓGICO E A MORFOLOGIA INTESTINAL DE JUVENIS
DO BIJUPIRÁ *Rachycentron canadum***

Victor Santos Lira da Nóbrega

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

Orientador: Dr. Ricardo Vieira Rodrigues

Co-orientador: Dra. Virgínia Fonseca Pedrosa

Rio Grande – RS - Brasil

Março, 2018

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUÇÃO GERAL.....	6
REFERÊNCIAS	13
ANEXO.....	23
CONCLUSÃO FINAL.....	42

1 **Resumo Geral**

2 O bijupirá apresenta grande potencial para produção devido sua elevada taxa de
3 crescimento, rusticidade durante o manejo e elevado valor de mercado, sendo a única
4 espécie peixe marinho que vem sendo produzida comercialmente no Brasil. A aplicação
5 de substâncias com propriedades imunoestimulantes, como o alho, tem sido considerada
6 uma abordagem eficiente no manejo da saúde em peixes na aquicultura. Portanto, o
7 objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos da adição de alho na ração no
8 desempenho zootécnico e nos índices hematológicos e imunológicos de juvenis de
9 bijupirá *Rachycentron canadum*. Os juvenis com ~170 g e 30 cm foram estocados em
10 seis tanques-rede de 12 m³ (40 juvenis por tanque-rede) na Maricultura Costa Verde,
11 litoral sul do Rio de Janeiro. Três tanques foram alimentados com ração úmida
12 (controle) e três tanques com ração úmida com 1% do peso úmido total adicionado de
13 alho/Kg (tratamento). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia durante 68 dias.
14 Ao final do período experimental não foram observadas diferenças significativas
15 ($P>0,05$) no desempenho zootécnico entre os tratamentos. Os índices zootécnicos entre
16 o controle e o tratamento, foram respectivamente: ganho de peso foi de 80 e 93%;
17 biomassa final foi de 12,62 Kg e de 12,66 Kg; taxa de conversão alimentar aparente 4,9
18 e 5,5 e sobrevivência de 99 e 97%. Foram significativamente maiores os linfócitos
19 circulantes, assim como foi observada uma maior expressão fenotípica nos linfócitos
20 CD3 (cel/mm²) e CD4 (cel/mm²) nos rins dos peixes alimentados com ração contendo
21 alho. Os monócitos (%), trombócitos (%) e relação N:L foram significativamente
22 maiores nos peixes que se alimentaram da ração sem alho. Na porção média do intestino
23 a altura da vilosidade (mm) e números de vacúolos (mm) foram também superiores nos
24 peixes alimentados com adição de alho. Portanto, o alho beneficiou o sistema
25 imunológico e a morfologia intestinal de juvenis do bijupirá, sendo recomenda sua
26 inclusão na alimentação dos peixes.

27

28 **Palavras-chaves:** piscicultura marinha, sistema imune, tanque-rede.

29

30

31

32

33

34

35 **ABSTRACT**

36 Cobia is a species that presents attributes that qualify it as a target for breeding: high
37 availability, ease of obtaining natural resources in captivity, multiple spawns within the
38 same reproductive period, rapid growth, ease of handling, resistance to variations in
39 water quality, acclimatization to tanks and adaptability to commercial diets. It can be
40 created in ponds and recirculation systems, but the main breeding system is net tanks,
41 which can be installed in bays or open sea and its creation in Brazil is already a reality.
42 The application of substances with immunostimulants properties, such as garlic, has
43 been considered an efficient approach in fish health management in aquaculture. The
44 objective of the present study was to determine the effects of garlic addition on feed in
45 the zootechnical performance and hematological and immunological indices of
46 juveniles of cobia *Rachycentron canadum*. Juveniles of ~ 170 g and 30 cm were stored
47 in six 12 m³ net tanks (40 juveniles per net tank) at Mariculture Costa Verde, south
48 coast of Rio de Janeiro. Three tanks were fed with moist ration (control) and three tanks
49 with moist ration with 1% of the total moist weight added of garlic / kg (treatment). Fish
50 were fed twice daily for 68 days. At the end of the experimental period, there were no
51 significant differences ($P > 0.05$) in the zootechnical performance between treatments.
52 The zootechnical indexes between control and treatment were, respectively: weight gain
53 80 and 93%; final biomass 12.62 kg and 12.66 kg; apparent feed conversion rate 4.9 and
54 5.5; survival rates 99% and 97%. Circulating lymphocytes were improved, as well as
55 higher phenotypic expression in CD3 (cel/mm²) and CD4 (cel/mm²) lymphocytes in the
56 kidneys of fish fed with the feed with garlic. Monocytes (%), thrombocytes (%) and
57 N:L ratio were significantly higher in fish fed with feed without. In the middle portion
58 of the intestine the villus height (mm) and vacuole numbers (mm) were also higher in
59 fish fed with feed with garlic. Thus, it is recommended the inclusion of 1% garlic, the
60 cobia had the immune system stimulated and benefited the intestinal morphology of
61 juveniles of bijupirá providing a greater absorptive capacity of the fish.

62

63 **Keywords:** Marine fish farm, immune system, net tank.

64

65

66

67

68

69 1. INTRODUÇÃO GERAL

70 1.1 Descrição da espécie

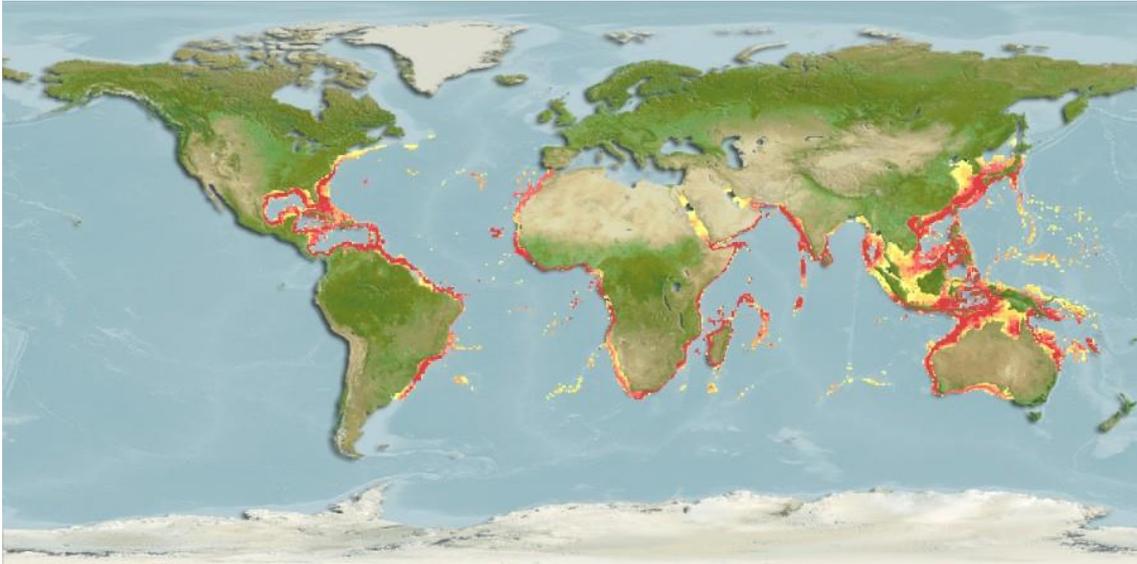
71 O bijupirá (Figura 1), também conhecido por cobia, é a única espécie da família
72 Rachycentridae. No ambiente natural, o bijupirá é encontrado normalmente sozinho ou
73 formando pequenos cardumes, nas proximidades de estruturas flutuantes ou mesmo
74 distribuído na coluna d'água (Shaffer & Nakamura, 1989). O bijupirá é espécie de peixe
75 de hábito migratório e pelágico, o bijupirá está distribuído em todos os mares tropicais e
76 subtropicais, exceto a parte central e oriental do Oceano Pacífico, não sendo encontrado
77 apenas no Mar Mediterrâneo e na costa leste do Oceano Pacífico (Shaffer & Nakamura,
78 1989). No Atlântico ocidental está distribuída desde o Canadá até as Ilhas Bermudas e,
79 de Massachusetts (EUA) até a Argentina, incluindo Golfo do México e Caribe (Robins
80 & Ray, 1986; Scott & Scott, 1988; Smith, 1997) (Figura 2). No Brasil, o *R. canadum*
81 está presente em todo o litoral, porém em maior abundância na Região Nordeste
82 (Figueiredo & Menezes, 1980). Esta espécie habita regiões de estuários, associados a
83 recifes e zona costeira em profundidade até 1.200 m (Shaffer & Nakamura, 1989; Riede,
84 2004). A distribuição do bijupirá tem influência direta da temperatura, tendo preferência
85 por ambientes de águas quentes. No entanto, há registro de ocorrência da espécie em
86 regiões temperadas durante os meses de verão, sendo encontrada em águas de
87 temperatura variando de entre 17 a 32 °C (Shaffer & Nakamura, 1989).

88 É uma espécie que possui hábito alimentar carnívoro, de comportamento muito
89 voraz na alimentação, podendo engolir presas inteiras (Darracott, 1977). Na natureza, o
90 bijupirá alimenta-se de crustáceos, invertebrados bentônicos e peixes (Fischer *et al.*,
91 1990; Collette, 1999). No litoral do nordeste do Brasil o bijupirá se alimenta
92 basicamente de teleósteos (Cavalli *et al.*, 2011).



93

94 Figura 1: Exemplar juvenil de *Rachycentron canadum*. (Foto: Victor Lira)



95
96 Figura 2: Área de distribuição do *Rachycentron canadum*. (www.fishbase.com.br)

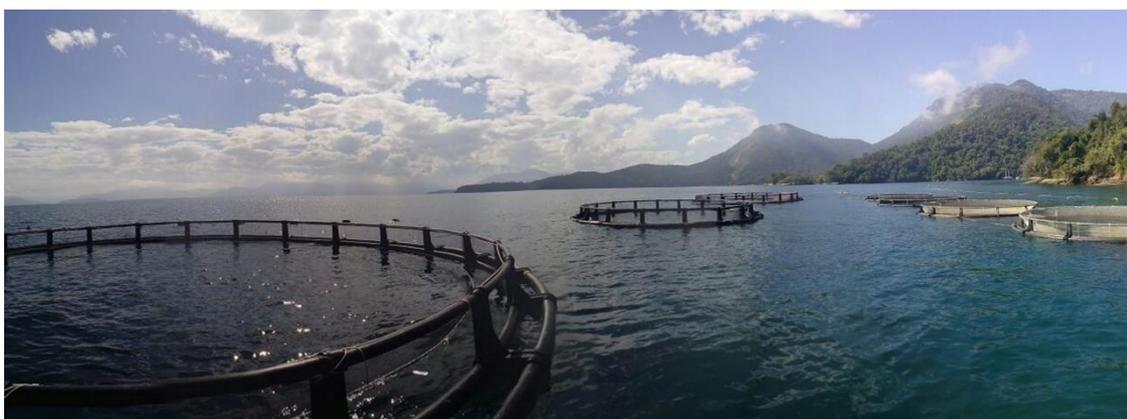
97 98 **1.2 Aquicultura do Bijupirá**

99 Os primeiros trabalhos sobre a criação de bijupirá em cativeiro começaram nos
100 Estados Unidos na década de 70 (Hassler & Rainville, 1975). Porém, o primeiro registro
101 da produção comercial dessa espécie teve início apenas nos anos 90 em Taiwan, estando
102 sua criação em desenvolvimento após o ano 2000, devido às suas excelentes
103 características de desempenho zootécnico (Liao *et al.*, 2004; Liao & Leños, 2007). O
104 sucesso atingindo por Taiwan é o maior exemplo para estimular o desenvolvimento da
105 criação dessa espécie em outros países. Além dos países asiáticos, o bijupirá vem sendo
106 criado em diversos vários outros países (Liao *et al.*, 2004; Benetti *et al.*, 2010; Cavalli *et*
107 *al.*, 2011; Sampaio *et al.*, 2011). A produção mundial de bijupirá em cativeiro em 2015
108 foi de 42.494,03 toneladas (FAO, 2017).

109 Vários atributos qualificam a espécie como alvo para criação são: elevada
110 fecundidade, facilidade de obtenção de desovas naturais em cativeiro, múltiplas desovas
111 dentro do mesmo período reprodutivo, rápido crescimento, facilidade de manejo,
112 resistência às variações de qualidade de água, aclimação a tanques e adaptabilidade
113 para rações comerciais (Arnold *et al.*, 2002; Schwarz *et al.*, 2004; McLean *et al.*, 2009).
114 Estudos já foram realizados sobre o bijupirá e suas necessidades em cativeiro,
115 especialmente focados na reprodução (Franks *et al.*, 2001; Arnold *et al.*, 2002;
116 Peregrino *et al.*, 2014), efeitos da qualidade de água sobre o crescimento (Faulk & Holt,
117 2006; Resley *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2011, Rodrigues *et al.*, 2015) e fatores de
118 alimentação (frequência alimentar) e nutricionais (requerimento de proteína, lipídios,

119 aminoácidos, ácidos graxos, minerais, vitaminas) (Wang *et al.*, 2005; Craig *et al.*, 2006;
120 Liu *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2013; Costa-Bonfim *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2014;
121 Moreira *et al.*, 2015; Nie *et al.*, 2016). O bijupirá apresenta uma alta taxa de
122 crescimento, chegando a atingir em 1 ano de produção de 4 a 6 kg (Liao *et al.*, 2004;
123 Benetti *et al.*, 2008) e 8 a 10 Kg em 1 ano e 6 meses (Liao *et al.*, 2004). O bijupirá
124 apresenta uma excelente qualidade de carne durante o processamento, apresentando um
125 bom rendimento e também um elevado valor comercial (Liao & Leños, 2007,
126 Gonçalves *et al.*, 2014).

127 O bijupirá pode ser criado em diversos tipos de sistemas de criação, como em
128 sistemas de recirculação de água (RAS), com boas taxas de crescimento e sobrevivência
129 de larvas e juvenis (Faulk *et al.*, 2007; Riche *et al.*, 2013). Os viveiros são outro sistema
130 produtivo empregado para produção de larvas e juvenis do bijupirá (Weirich *et al.*,
131 2004; Ribeiro *et al.*, 2014). O principal sistema de criação utilizado no mundo para o
132 bijupirá são os tanques-redes. Os tanques-redes podem ter variadas formas e tamanhos,
133 e podem ser implantados em áreas protegidas, como baías e enseadas (Nhu *et al.*, 2011;
134 Sampaio *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2015; Bezerra *et al.*, 2016), ou mesmo em mar
135 aberto (Liao & Leño, 2007; Benetti *et al.*, 2010; Cavalli *et al.*, 2011). A produção de
136 bijupirá pela aquicultura brasileira já é uma realidade sendo a única espécie de peixe
137 marinho produzida no Brasil, porém não existem dados oficiais de sua produção
138 atualmente no país. Domingues *et al.* (2014) demonstrou que a criação de bijupirá em
139 tanque-rede em mar aberto no litoral de Pernambuco seria rentável se a produtividade
140 fosse maior ou igual a 10 kg.m^{-3} e se o valor de venda fosse de pelo menos $\text{R}\$15,00 \text{ kg}^{-1}$.
141 Enquanto a criação de bijupirá em tanques-rede em mar aberto em Pernambuco e em
142 baías protegidas no Rio de Janeiro (Figura 3) são economicamente viáveis (Bezerra *et*
143 *al.*, 2016).

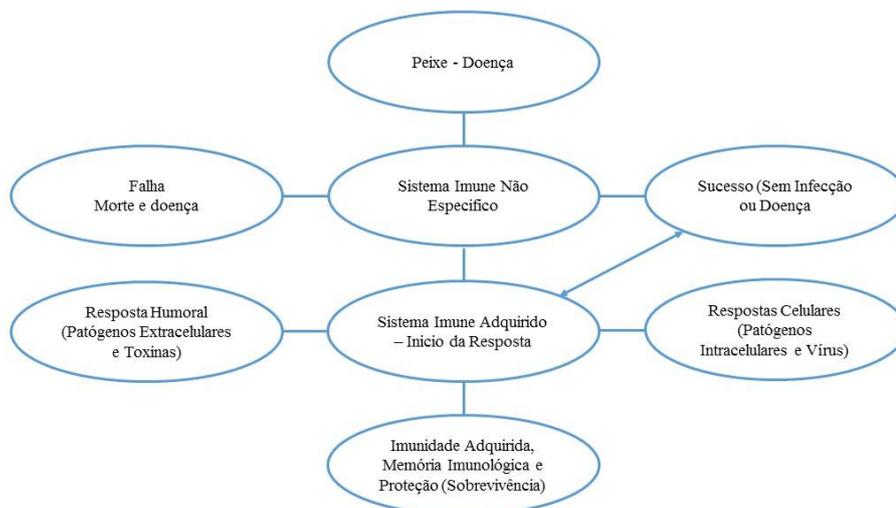


144
145 Figura 3: Tanques-redes para criação de bijupirá. (Foto: Victor Lira)

146

147 1.3 Sistema Imunológico

148 O sistema imunológico é classificado em sistema imune inato, inespecífico ou
149 natural e sistema imune adaptativo, específico ou adquirido, o qual é responsável pela
150 defesa do organismo (Abbas *et al.*, 2007) (Figura 4). A ativação do sistema imune
151 inespecífico em peixes é a primeira ação contra a presença de um agente patogênico e
152 na contenção de muitas infecções sem ativação do sistema imune específico (Levraud &
153 Boudino, 2009). O sistema adquirido apresenta resposta imune humoral e celular,
154 envolvendo os órgãos e tecidos linfóides, células apresentadoras de antígeno (APCs),
155 linfócitos T e B, imunoglobulinas e moléculas do sistema complemento (Watts *et al.*,
156 2001), concedendo a este sistema de defesa a produção de anticorpos ou células
157 citotóxicas específicas para cada antígeno, criando memória imunológica (Trichet,
158 2010).



159

160 Figura 4: Resposta do sistema imunológico de peixe frente à invasão por patógeno
161 (adaptado de Shoemaker *et al.*, 2001).

162 Os linfócitos, monócitos, neutrófilos e trombócitos são leucócitos, regularmente
163 observados na circulação dos peixes. São células com função de defesa do organismo,
164 usando vias sanguíneas para o controle de possíveis infecções e ou danos em tecidos
165 (Satake *et al.*, 2009). Os linfócitos são células diretamente ligadas ao sistema imune. São
166 bastante diferenciados e que apresentam resposta frente a estímulos imunológicos (Ellis,
167 1977). São relatados na literatura como os mais abundantes entre os leucócitos em
168 peixes teleósteos (Fänge, 1992; Hrubec & Smith, 2010; Campbell, 2012). Os linfócitos

169 transitam por todo o corpo através do sangue ou linfa, se concentram nos órgãos
170 linfóides, podendo estar presentes em outros tecidos afetados ou não por meio de
171 processos inflamatórios (Peleteiro & Richards, 1985; Hibiya, 1994).

172 Os linfócitos se dividem em dois grupos diferentes de população linfocitária, os
173 que produzem imunoglobulinas (células B) e os que fazem sinalização imunológica ou
174 possuem grânulos tóxicos a agentes patogênicos (células T) (Farrel, 2011). Todos os
175 linfócitos obtêm o receptor CD3 ao chegar ao timo, que é um marcador universal, logo
176 são divididos de acordo com a sua função em duas subpopulações linfocitárias
177 principais, os linfócitos T CD4⁺ ou auxiliares e os linfócitos T CD8⁺ ou citotóxicos, o
178 linfócito T4 tem uma função importante em colocar em funcionamento todo o sistema
179 imune e atua como um elo entre a imunidade inespecífica e específica (Romano, 2010).
180 No bijupirá, é possível encontrar no rim anterior linfócitos com receptores CD3⁺ a partir
181 do oitavo dia após a eclosão e, linfócitos com receptores CD4⁺ a partir do décimo
182 terceiro dia após a eclosão (Klosterhoff *et al.*, 2015). Uma produção maior de linfócitos
183 T indica uma maior estimulação imune do organismo (Führ *et al.*, 2016).

184 Os monócitos, conhecidos também como macrófagos circulantes (Hrubec &
185 Smith, 2010), representam a primeira célula fagocítica em peixes (Ellis, 1977). Eles têm
186 a habilidade de migrar da corrente sanguínea até o foco inflamatório, durante processos
187 de infecção ou induzidos artificialmente (Belo *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2009; Santos
188 *et al.*, 2009). Os macrófagos são derivados dos monócitos, fagocitam substâncias
189 estranhas abióticas e bióticas, como diferentes patógenos. Desempenham um papel de
190 grande importância na resposta imune, por ser uma célula fagocítica, produz e libera
191 citocinas, participam do processo da apresentação de antígenos aos linfócitos, células do
192 sistema imune adaptativo (Secombes & Fletcher, 1992; Cuesta *et al.*, 1999).

193 Os trombócitos dos peixes são similares às plaquetas em mamíferos (Grant,
194 2015). São leucócitos que tem participação na defesa orgânica, envolvendo
195 principalmente a coagulação sanguínea (formação de trombos) (Ellis, 1977; Fänge,
196 1992; Hine, 1992; Grant, 2015). Mas também atuam na fagocitose, em particular na
197 remoção de vestígios de células ou tecidos mortos ou danificados (Matushima &
198 Mariano, 1996; Tavares-Dias *et al.*, 2007). Possuem a capacidade de migrar para o foco
199 inflamatório em procedimentos induzidos em experimentos (Ranzani-Paiva *et al.*,
200 2013).

201 A inclusão de alho na ração de peixes é capaz de alterar o perfil leucocitário de
202 maneira benéfica ao peixe, como já é demonstrado em diversos estudos para truta arco-

203 íris (Nya & Austin, 2009; Nya & Austin, 2011), barramudi (Talpur & Ikhwanuddin,
204 2012) e também espécies nativas de peixes de água doce que são alvo da aquicultura no
205 Brasil, como o tambaqui (Inoue *et al.*, 2016) e o pacu (Martins *et al.*, 2002). Por
206 exemplo, o estresse em peixes pode causar uma mudança no perfil de leucócitos
207 (aumento do número de neutrófilos e diminuição dos linfócitos circulantes),
208 demonstrando que podem estar relacionados a glicocorticoides elevados, endógenos e
209 exógenos (Wojtaszek *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2011). A relação
210 neutrófilos:linfócitos (N:L) pode ser utilizada como índice de uma resposta de estresse
211 secundário como proposto por Davis *et al.* (2008). Portanto, será avaliado se o alho
212 adicionado ao alimento possui efeito positivo sobre o perfil leucocitário de juvenis de
213 bijupirá.

214

215 **1.3 Alho Como Imunoestimulante**

216 Nos últimos anos, a utilização de imunoestimulantes tem recebido uma grande
217 atenção na aquicultura e têm sido utilizados como aditivos alimentares aplicados na
218 produção de peixes como tratamento alternativo para antibióticos, uma vez que foram
219 reportados por controlar patógenos ativando o sistema imunológico de peixes de criação
220 (Adel *et al.*, 2015; Van Hai, N., 2015). Plantas com histórico medicinal têm sido
221 avaliadas quanto a sua eficácia no sistema imune de várias espécies de peixes
222 produzidas (Talpur *et al.* 2013; Kanani *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016). O alho tem uma
223 história de aplicações alimentares e medicinais para o controle de várias doenças e atua
224 como um estimulante imunológico, incluindo várias espécies de peixes, como truta
225 arco-íris (Nya & Austin, 2009; Nya & Austin, 2011) e o barramudi (Talpur &
226 Ikhwanuddin, 2012). Os efeitos positivos são devidos a vários componentes sulfatados
227 do alho que proporcionam estas propriedades, porém o componente biológico mais
228 ativo e que particularmente tem recebido bastante atenção é a alicina (dialil-tiosulfinato)
229 (Miron *et al.*, 2004; Arnauta *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2005), que representa 70% dos
230 compostos sulfatados existentes no alho (Miron *et al.*, 2004; Arnauta *et al.*, 2003).

231 A suplementação da ração de peixes com alho vem sendo estudada para diversas
232 espécies de peixes. *O. mykiss* obtiveram maior crescimento e proteção contra infecção
233 de *Aeromonas hydrophila* quando alimentados com alho (Nya & Austin, 2009).
234 Enquanto, Nya & Austin (2011) observaram em *O. mykiss* que o efeito protetor do alho
235 se estendeu por 28 dias após a sua administração aos peixes. Já a truta marrom *Salmo*
236 *caspius* apresentou melhor crescimento, menor mortalidade e foi observada estimulação

237 do sistema imunológico, por meio de maior atividade da lisozima e quantidade de
238 proteína total plasmática nos peixes que foram alimentados com 20g/Kg de alho na
239 ração (Zaefarian *et al.*, 2017). Juvenis de bijupirá alimentados com 1,3, 2 e 3 % de
240 alho na ração, tiveram melhor crescimento e maior proteção contra a *Photobacterium*
241 *damselae* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* em relação ao que não se
242 alimentaram da ração suplementada com alho (Guo *et al.*, 2015). Guo *et al.* (2012)
243 observaram que juvenis de *Epinephelus coioides* alimentados com 1,3 e 4% obtiveram
244 maior ganho de peso e aumento da eficiência alimentar, como também uma menor
245 mortalidade quando desafiados a *Streptococcus iniae*. Barramundis *Lates calcafier*
246 alimentados com ração contendo 5, 10, 15, 20 % quantidade de alho, obtiveram melhor
247 crescimento e demonstraram maior resistência contra infecções bacteriana e foi
248 observado que o sistema imune foi estimulado (Talpur & Ikhwanuddin, 2012).
249 Enquanto, trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* quando alimentadas com 2,5%
250 apresentaram um aumento na quantidade de melanomacrófagos nos rins, indicando uma
251 estimulação na remoção de partículas estranhas ou produtos de degradação celular nos
252 peixes (Breyer *et al.*, 2015). No entanto, não há estudos sobre o efeito imunoestimulante
253 do alho para o bijupirá.

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 272 ABBAS, A.K., POBER, J.S., LICHTMAN, A.H. 2007. Cellular and Molecular
273 Immunology. Saunderd. Vol. 6. 572p.
- 274 ADEL, M., AMIRI, A.A., ZORRIEHZAHRA, J., NEMATOLAH, A., ESTEBAN,
275 M.A. 2015. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance,
276 chemical body composition and hematological and immune parameters of fry
277 Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). Fish and Shellfish Immunology 45: 841–
278 847.
- 279 ANDERSON, P.A., BERZINS, I.K., FOGARTY, F., HAMLIN, H.J., GUILLETTE,
280 L.J. 2011. Sound, stress, and seahorses: the consequences of a noisy environment to
281 animal health. Aquaculture 311: 129–138.
- 282 ARNOLD, C.R., KAISER, J.B., HOLT, G.J., 2002. Spawning of cobia *Rachycentron*
283 *canadum* in captivity. Journal World Aquaculture Society 33: 205–208.
- 284 ARNAULTA, I., CHRISTIDÈS, J. P., MANDON, N., HAFFNER, T., KAHANEC, R.
285 2003. High-performance ion-pairchromatography method for simultane ousanaly
286 sisofalliin, de oxyalliin, allicina and dipeptide precursorsin garlic products using
287 multiple mass spectrometry and UV detection. Journal of Chromatography 991: 69–
288 75.
- 289 BELO, M.A.A., SCHALCK, S.H.C., MORAES, F.R., SOLARIS, V.E.OTOBONI,
290 A.M.M.B., MORAES, J.E.R. 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E
291 and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the
292 teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. Journal of Comparative Pathology 133: 146–
293 154.
- 294 BENETTI, D.D., SARDENBERG, B., WELCH, A., HOENIG, R., ORHUN, M.R.,
295 ZINK, I. 2008. Intensive larval husbandry and fingerling production of cobia
296 *Rachycentron canadum*. Aquaculture 281: 22-27.
- 297 BENETTI, D.D., O'HANLON, B., RIVERA, J.A., WELCH, A.W., MAXEY, C.,
298 ORHUN, M.R. 2010 Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in
299 open ocean submerged cages in the Caribbean. Aquaculture 302: 195-201.
- 300 BEZERRA, T.R.Q., DOMINGUES, E.C., FILHO, L.F.A.M., ROMBENSO, A.N.,
301 HAMILTON, S., CAVALLI, R.O. 2016. Economic analysis of cobia (*Rachycentron*
302 *canadum*) cage culture in large- and small-scale production systems in Brazil.
303 Aquaculture Internacional 24(2): 609-622.

304 BREYER, K. E., GETCHELL, R. G., CORNWELL, E. R., WOOSTER, G. A. 2015.
305 Efficacy of an Extract from Garlic, *Allium sativum*, Against Infection with the
306 Furunculosis Bacterium, *Aeromonas salmonicida*, in Rainbow Trout, *Oncorhynchus*
307 *mykiss*. Journal of the World Aquaculture Society 46(3): 273-282.

308 CAMPBELL, T.W. 2012. Hematology of fish. In: THRALL M.A., WEISER, G.,
309 ALLISON, R., CAMPBELL, T.W. (eds.). Veterinary hematology and clinical
310 chemistry. John Wiley & Sons, Ames. Vol. 2: 298–312.

311 CAVALLI, R.O., DOMINGUES, E.C., HAMILTON, S. 2011. Desenvolvimento da
312 produção de peixes marinhos em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios.
313 Revista Brasileira Zootecnia 40: 151-164.

314 COLLETE, B.B. 1999. Rachycentridae. Cobia. p. 2655. In K.E. Carpenter and V.H.
315 Niem (eds.) FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine
316 resources of the Western Central Pacific. Volume 4. Bony fishes part 2 (Mugilidae to
317 Carangidae). FAO, Rome.

318 COSTA-BONFIM, C.N., PESSOA, W.V.N., OLIVEIRA, R.L.M., FARIAS, J.L.,
319 DOMINGUES, E.C., HAMILTON, S., CAVALLI, R.O. 2014. The effect of feeding
320 frequency on growth performance of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*
321 (Linnaeus, 1766). Journal Applied Ichthyology 30: 135–139.

322 CRAIG, S.R., SCHWARZ, M.H., MCLEAN, E. 2006. Juvenile cobia (*Rachycentron*
323 *canadum*) can utilize a wide range of protein and lipid level swith out impacts on
324 production characteristics. Aquaculture 261: 384–391.

325 CUESTA, A., ESTEBAN, M.A., MESEGUER, J. 1999. Natural cytotoxic activity of
326 gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes - Assessment by flow cytometry
327 and microscopy. Veterinary Immunology and Immunopathology 71: 161-171.

328 DARRACOTT, A. 1977. Availability, morphometrics, feeding and breeding activity in
329 a multi-species, demersal fish stock of the western Indian Ocean. Journal Fish
330 Biology 10(1): 1-16.

331 DAVIS A.K., MANEY D.L., MAEZ J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to
332 measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Functional Ecology 22: 760–
333 772.

334 DOMINGUES, E.C., HAMILTON, S., BEZERRA, T.R.Q., CAVALLI, R.O. 2014.
335 Viabilidade econômica da criação do beijupirá em mar aberto em Pernambuco.
336 Boletim do Instituto de Pesca 40: 237–249.

337 ELLIS, A.E. 1977. The leucocytes of fish: A review. Journal Fish Biology 11: 453-491.

338 FAO, 2017. Fishery and Aquaculture Statistics. Global capture production 1950-2015
339 (FishStatJ). In: FAO Fisheries and Aquaculture Department (online). Rome.
340 Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>. Acessado
341 em 15 de setembro de 2017.

342 FÄNGE, R. 1992. Fish Blood Cells. In: HOAR, W.S., RANDALL, D.J., FARRELL,
343 A.P. (eds.). Fish Physiology 12: 1-54.

344 FARREL, A.P. 2011. Cellular Composition of the Blood. In: FARREL, AP (ed.).
345 Encyclopedia Of Fish Physiology: From Genome To Environment. Academic Press,
346 Elsevier, United States of America. Vol. 1: 984-991.

347 FAULK, C.K., HOLT, G.J. 2006. Responses of cobia *Rachycentron canadum* larvae to
348 abrupt or gradual changes in salinity. *Aquaculture* 254(1-4): 275–283.

349 FAULK, C.K., KAISER, J.B., HOLT, G.J. 2007. Growth and survival of larval and
350 juvenile cobia *Rachycentron canadum* in a recirculating raceway system.
351 *Aquaculture* 270: 149-157.

352 FIGUEIREDO, J.L., MENEZES, N.A. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do
353 Brasil. III. Teleostei (2). São Paulo: Museu de Zoologia da USP. 90p.

354 FISCHER, W., SOUSA, I., SILVA, C., DE FREITAS, A., POUTIERS, J.M.,
355 SCHNEIDER, W., BORGES, T.C., FERAL, J.P., MASSINGA, A. Massinga, 1990.
356 Fichas FAO de identificação de espécies para actividades de pesca. Guia de campo
357 das espécies comerciais marinhas e de águas salobras de Moçambique. Publicação
358 preparada em colaboração com o Instituto de Investigação Pesqueira de
359 Moçambique, com financiamento do Projecto PNUD/FAO MOZ/86/030 e de
360 NORAD. Roma, FAO. 424 p.

361 FRANKS, J.S., OGLE, J.T., LOTZ, J.M., NICHOLSON, L.C., BARNES, D.N.,
362 LARSEN, K.M. 2001. Spontaneous spawning of cobia, *Rachycentron canadum*,
363 induced by human chorionic gonadotropin (HCG), with comments on fertilization,
364 hatching and larval development. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries*
365 *Institute* 52: 598–609.

366 FÜHR, F., TESSER, M.B., RODRIGUES, R.V., PEDRON, J., ROMANO, L.A. 2016.
367 Artemia enriched with hydrolyzed yeast improves growth and stress resistance of
368 marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Aquaculture* 450: 173-181.

369 GONÇALVES, A.A., NETO, A.B.D., GUILHERME, D.D., MARQUES, M.K.,
370 SALES, T.M.O., LIMA, J.T.A.X., RIBEIRO, F.A.S., DIÓGENES, A.F. 2014.
371 Rendimento de Cortes e Qualidade da Carne do Beijupirá, *Rachycentron canadum*,

372 Sujeito a Diferentes Gradientes de Salinidade da Água de Cultivo. Cap. 10. In:
373 Ensaio com o Beijupirá: *Rachycentron canadum*. 2014. NUNES, A.J.P. Ministério
374 da Pesca e Aquicultura/ CNPQ / UFC.

375 GUO, J.J., KUO, C.M., CHUANG, J.W., HONG, J.W., CHOU, R.L., CHEN, T.I. 2012.
376 The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activity against
377 *Streptococcus iniae* and on growth in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*.
378 *Aquaculture* 364–365: 33–38.

379 GUO, J.J., KUO, C.M., HONG, J.W., CHOU, R.L., LEE, Y.H., CHEN, T.I. 2015. The
380 effects of garlic supplemented diets on antibacterial activities against
381 *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* and *Streptococcus iniae* and on growth in
382 *Cobia*, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 435: 111 – 115.

383 GRANT, K.R. 2015. Fish Hematology and Associated Disorders. *Veterinary Clinics of*
384 *North America: Exotic Animal Practice* 18: 83–103.

385 HASSLER, W.W., RAINVILLE, R.P. 1975. Techniques for hatching and rearing cobia,
386 *Rachycentron canadum*, through larval and juvenile stages, UNC Sea Grant College
387 Program, UNC-SG-75-30.

388 HIBIYA, T. 1994. An atlas of fish histology: normal and pathological features.
389 Stuttgart: Gustav Fish Verlag: 5-125.

390 HINE, P.M. 1992. The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunology* 2: 79-88.

391 HRUBEC, T.C., SMITH, S.A. 2010. Hematology of fishes. In: WEISS, D.J.,
392 WARDROP, K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6^a ed. Ames: Blackwell
393 Publishing 126: 994-1004.

394 INOUE, L.A.K.A., MARCIEL, P.O., AFFONSO, E.G., BOIJINK, C.L., TAVARES-
395 DIAS, M. 2016 Growth, parasitic infection and hematology in *Colossoma*
396 *macropomum* Cuvier, 1818 fed diets containing *Allium sativum*. *Journal of Applied*
397 *Ichthyology* 32: 901 – 905.

398 KANANI, H.G., NOBAHAR, Z., KAKOOLAKI, S., JAFARIAN, H. 2014. Effect of
399 ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological
400 parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. *Fish Physiology and*
401 *Biochemistry* 40: 481-490.

402 KLOSTERHOFF, M.C., PEREIRA, J., RODRIGUES, R.V., GUSMÃO, E.P.,
403 SAMPAIO, L.A., TESSER, M.B., ROMANO, L.A. 2015. Ontogenic development of
404 kidney, thymus and spleen and phenotypic expression of CD3 and CD4 receptors on

405 the lymphocytes of cobia (*Rachycentron canadum*). Annals of the Brazilian
406 Academy of Sciences 87(4): 2111-2121.

407 LEVRAUD, J.P., BOUDINOT, P. 2009. The immune system of teleost fish. Med.Sci.
408 25(4): 405-11.

409 LIAO, I.C., HUANG, T.S., TSAI, W.S., HSUEH, C.M., CHANG, S.L., LEAÑOS,
410 E.M. 2004. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. Aquaculture 237:
411 155-165.

412 LIAO, I.C., LEAÑOS, E.M. 2007 Cobia Aquaculture: Research, development and
413 comercial production. Co-publicado por: Asian Fisheries Society; The Fisheries
414 Society of Taiwan; World Aquaculture Society and National Taiwan Ocean
415 University. 178p.

416 LIU, K., AI, Q.H., MAI, K.S., ZHANG, W.B., ZHANG, L., ZHENG, S.X. 2013.
417 Dietary manganese requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum* L.
418 Aquaculture Nutrition 19(4): 461-467.

419 MARTINS, M.L., MORAES, F.R., MIYAZAKI, D.M.Y., BRUM, C.D., ONAKA,
420 E.M., FENERICK Jr, J., BOZZO, F.R. 2002. Alternative Treatment for
421 *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylodyridae) Infection in Cultivated
422 Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and its
423 Haematological Effects. Parasite 9(2): 175-180.

424 MARTINS, M.L., MYIAZAKI, D.M.Y., TAVARES-DIAS, M., FENERICK Jr. J.,
425 ONAKA, E.M., BOZO, F., FUJIMOTO, R.Y., MORAES, F.R. 2009. Characterization
426 of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus*
427 *male* x *Colossoma macropomum female*) (Osteichthyes). Brazilian Journal of
428 Biology 69(2): 631-637.

429 MATUSHIMA, E.R., MARIANO, M. 1996. Kinects of the inflammatory reaction
430 induced by carrageenin in the swinbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia).
431 Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science 33(1): 5-10.

432 MCLEAN, E., SALZE, G., SCHWARZ, M.H., CRAIG, S.R. 2009. Cobia cultivation,
433 in: Burnell, G., Allan, G. (Eds.). New Technologies in aquaculture: Improving
434 production efficiency, quality and environmental management. CRC Press, Boca
435 Raton: 804-821.

436 MIRON, T., BERCOVICI, T., RABINKOV, A., WILCHEK, M., MIRELMAN, D.
437 2004. Allicin: preparation and applications. Analytical Biochemistry 331: 364-369.

438 MOREIRA, C.B., ROMBENSO, A.N., CANDIOTTO, F.B., TSUZUKI, M.Y. 2015.
439 Feeding Frequency Affects Growth of Juvenile Cobia *Rachycentron canadum*
440 Cultured in Near-Shore Cages. Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo. 41(2):
441 219 – 226.

442 NHU, V.C., NGUYEN, H.Q., LE, T.L., TRAN, M.T., SORGELLOS, P.,
443 DIERCKENS, K., SVENNEVIG, N. 2011. Cobia *Rachycentron canadum*
444 aquaculture in Vietnam: Recent developments and prospects. Aquaculture 315(1-2):
445 20-25.

446 NIE, J., DONG, X., TAN, B., CHI, S., YANG, Q., LIU, H., SHUANG, Z. 2016. Effects
447 of dietary manganese sources and levels on growth performance, relative manganese
448 bioavailability, antioxidant activities and tissue mineral content of juvenile cobia
449 (*Rachycentron canadum* L). Aquaculture Research 47: 1402-1412.

450 NYA, E.J., AUSTIN, B. 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas*
451 *hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of
452 Fish Diseases 32: 963–970.

453 NYA, E.J., AUSTIN, B. 2011. Development of immunity in rainbow trout
454 (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary
455 application of garlic. Fish & Shellfish Immunology 30: 845-850.

456 PELETEIRO, M.C., RICHARDS, R.H., 1985. Identification of lymphocytes in the
457 epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Diseases
458 8(2): 161-172.

459 PEREGRINO, R.B., HAMILTON, S., DOMINGUES, E.C., MANZELLA, J.C.,
460 HAZIN, F.H.V., CAVALLI, R.O. 2014. Desempenho reprodutivo do beijupirá
461 (*Rachycentron canadum*) capturado no litoral de Pernambuco. Arquivo Brasileiro de
462 Medicina Veterinária e Zootecnia 66(3): 681-687.

463 RANZANI-PAIVA, M.J.T., PÁDUA, S.B., TAVARES-DIAS, M., EGAMI, M.I. 2013.
464 Métodos para análise hematológica em peixes. EDUEM. 140 p.

465 REN, M., AI, Q., MAI, K. 2014. Dietary arginine requirement of juvenile cobia
466 (*Rachycentron canadum*). Aquaculture Research 45(2): 225-233.

467 RESLEY, M.J., WEBB JR., K.A., HOLT, G.J., 2006. Growth and survival of juvenile
468 cobia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture
469 system. Aquaculture 253: 398-407.

470 RIBEIRO, F.A.S., JÚNIOR, A.P.B., MEDEIROS, A.E.L., BLANCO, B.S.,
471 MARQUES, D.F., SOARES, D.C.E., MAIA, E.P., OLIVEIRA, F.A., OLIVEIRA,

472 F.A.G., SILVA, G.H.G., FERNANDES, J.T.S., OLIVEIRA, J.L.F., FILHO, J.R.L.,
473 CACHO, J.C.S., SOUZA, L., MEDEIROS, M.A.A., CELEDONIO, N.R., PINTO,
474 R.C.C., AZEVEDO, M.S.B. 2014. Influência da Salinidade no Desempenho do
475 Beijupirá, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) e Avaliação da Engorda em
476 Viveiros Escavados. Cap. 7. In: Ensaios com o Beijupirá: *Rachycentron canadum*.
477 2014. NUNES, A.J.P. Ministério da Pesca e Aquicultura/ CNPQ / UFC.

478 RICHE, M.A., WEIRICH, C.R., WILLS, P.S., BAPTISTE, R.M. 2013. Stocking
479 density effects on production characteristics and body composition of market size
480 cobia, *Rachycentron canadum*, reared in recirculating aquaculture systems. Journal
481 of the World Aquaculture Society 44(2): 259-266.

482 RIEDE, K. 2004. Global register of migratory species - from global to regional scales.
483 Final Report of the R&D-Projekt 808 05 081. Federal Agency for Nature
484 Conservation, Bonn, Germany. 329p.

485 ROBINS, C.R., RAY, G.C. 1986. A field guide to Atlantic coast fishes of North
486 America. Houghton Mifflin Company, Boston, U.S.A. 354 p.

487 RODRIGUES, R.V., SCHWARZ, M.H., DELBOS, B.C., CARVALHO, E.L.,
488 ROMANO, L.A., SAMPAIO, L.A. 2011. Acute exposure of juvenile
489 cobia *Rachycentron canadum* to nitrate induces gill, esophageal and brain damage.
490 Aquaculture 322-323: 223-226.

491 RODRIGUES, R.V., PEDRON, J.P. ROMANO, L.A., TESSER, M.B., SAMPAIO,
492 L.A. 2015. Acute responses of juvenile cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus
493 1766) to acid stress. Aquaculture Research 46(5): 1241-1247.

494 ROMANO, L.A. 2010. El sistema Imune Inespecífico de los Peces. Em: Patologia
495 Sanidade de organismos Acuáticos. ABRAPOA. Silva –Souza A.T., Perez Lizama
496 M. A., Takemoto R. M., (Editores). 550p.

497 ROSE, P., WHITEMAN, M., MOORE, P.K., ZHU, Y.Z., 2005. BioactiveS-alk(en)yl
498 cysteine sulfoxide metabolites in the genus Allium: the chemistry of potential
499 therapeutic agents. Natural Product Reports 22: 351–368.

500 SAMPAIO, L. A., MOREIRA, C. B., MIRANDA-FILHO, K. C., ROMBENSO, A. N.
501 2011. Culture of cobia *Rachycentron canadum* (L) in near-shore cages off the
502 Brazilian coast. Aquaculture Research 42: 832 – 834.

503 SANTOS, A.A., EGAMI, M.I., RANZANI-PAIVA, M.J.T., JULIANO, Y. 2009.
504 Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus*

505 *parallellus*): seasonal variation, sex and gonadal maturation. *Aquaculture* 296(3-4):
506 359-366.

507 SATAKE, F., PÁDUA, S. B., ISHIKAWA, M. M. 2009. Distúrbios morfológicos em
508 células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. Cap. 13. In:
509 Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Tavares-Dias, M. Embrapa Amapá: 330-
510 345.

511 SCOTT, W.B., SCOTT, M.G. 1988. Atlantic fishes of Canada. *Canadian Bulletin of*
512 *Fisheries and Aquatic Sciences*. 219-731.

513 SCHWARZ, M.H., MCLEAN, E., CRAIG, S.R. 2004. Research experience with cobia:
514 larval rearing, juvenile nutrition and general physiology. In: Liao, I.C., Leño, E.M.
515 Cobia Aquaculture: Research, Development and Commercial Production. Taiwan:
516 Asian Fisheries Society:1-17.

517 SECOMBES, C.J., FLETCHER, T.C. 1992. The role of phagocytes in the protective
518 mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases Journal* 2: 53-71.

519 SHAFFER, R.V., NAKAMURA, E. L. 1989. Synopsis of biological data on the cobia
520 *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). Washington, D.C: FAO Fisheries
521 Synopsis.153 (National Marine Fisheries Service/S 153), U.S. Department of
522 Commerce, NOAA Technical Report, National Marine Fisheries Service 82.

523 SMITH, C.L. 1997. National Audubon Society field guide to tropical marine fishes of
524 the Caribbean, the Gulf of Mexico, Florida, the Bahamas, and Bermuda. Alfred A.
525 Knopf, Inc., New York. 720p.

526 SHOEMAKER, C.A., KLESIUS, P.H., LIM, C. 2001. Immunity and Disease
527 Resistance in Fish. In: Lim, C., Webster, C.D. *Nutrition and Fish Health*. New York:
528 Food Products Press: 149-162.

529 TALPUR, A.D., IKHWANUDDIN, M. 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*)
530 on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance
531 against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch).
532 *Aquaculture* 364-365: 6–12.

533 TALPUR, A.D., IKHWANUDDIN, M., BOLONG, A.A. 2013. Nutritional effects of
534 ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates*
535 *calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 400-
536 401: 46-52.

537 TAVARES-DIAS, M., ONO, E.A., PILARSKI, F., MORAES, F.R. 2007. Can
538 thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of

539 teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *Journal of Applied*
540 *Ichthyology* 23: 709-712.

541 TRICHET, V.V., 2010. Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research* 41:
542 829: 321-449.

543 VAN HAI, N. 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a
544 review. *Aquaculture* 446: 88–96.

545 WANG, J.T., LIU, Y.J., TIAN, L.X., MAI, K.S., DU, Z.Y., WANG, Y., YANG, H.J.
546 2005. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition,
547 hepaticlipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 249:
548 439–447.

549 WATSON, A.M., BARROWS, F.T., PLACE, A.R. 2013. Taurine supplementation of
550 plant derived protein and n-3 fatty acids are critical for optimal growth and
551 development of cobia, *Rachycentron canadum*. *Lipids* 48(9): 899-913.

552 WATTS, M., MUNDAY, B.L., BURKE, C.M. 2001. cDNA sequences and organization
553 of IgM heavy chain genes in two holostean fish. *Developmental and Comparative*
554 *Immunology* 19: 153-164.

555 WEIRICH, C.R.; SMITH, T.I.J.; DENSON, M.R.; STOKES, A.D.; JENKINS, W.E.
556 2004 Pond culture of larval and juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, in the
557 Southeastern United States: initial observations. *Journal of Applied Aquaculture*,
558 16(1/2): 27-44.

559 WOJTASZEK, J., DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D., LOZINSKA-GABSKA, M.,
560 ADAMOWICZ, A., DZUGAJ, A. 2002. Hematological effects of high dose of
561 cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. *General*
562 *and Comparative Endocrinology* 125: 176–183.

563 WU, Y., CHEN, Y., UENG, P. NAN, F. 2016. Effects of medicinal herbs “*Plantago*
564 *asiatica*”, “*Houttuynia cordata*” and “*Mentha haplocalyx*” on non-specific immune
565 responses of cobia (*Rachycentron canadum*). *Fish & Shellfish Immunology* 58: 406-
566 414.

567 ZAEFARIAN, A., YEGANEH, S., ADHAMI, B. 2017. Dietary effects of garlic powder
568 (*Allium sativum*) on growth, blood indices, carcass composition, and lysozyme
569 activity in brown trout (*Salmo caspius*) and resistance against *Yersinia ruckeri*
570 infection. *Aquacultura Internacional* 25(6): 1987-1996.

571

572

573 **OBJETIVO GERAL**

574 Avaliar o efeito da suplementação de alho na ração em juvenis do bijupirá
575 *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede “near-shore”.

576

577 **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

578 • Aferir a influência do alimento suplementado com alho no desempenho
579 zootécnico de juvenis de bijupirá.

580 • Determinar os efeitos da adição de alho na ração nos índices
581 hematológicos e imunológicos de juvenis de bijupirá.

582 • Investigar alterações na morfologia intestinal dos juvenis de bijupirá em
583 função da adição de alho no alimento.

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

Anexo

607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ALHO MODULA POSITIVAMENTE O
SISTEMA IMUNOLÓGICO E A MORFOLOGIA INTESTINAL DE JUVENIS
DO BIJUPIRÁ *Rachycentron canadum***

641 **RESUMO**

642 O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da inclusão de alho na ração de juvenis
643 de *Rachycentron canadum*. Os juvenis (N = 40 por tanque-rede, N total = 120 por
644 tratamento), com ~ 170 g e 30 cm foram submetidos a dois tratamentos: inclusão de 1%
645 de alho na ração e tratamento controle (sem adição de alho). O período experimental
646 teve duração de 68 dias e os peixes foram alimentados duas vezes ao dia. Ao final do
647 período experimental foi avaliado o desempenho zootécnico, parâmetros hematológicos
648 e imunológicos, assim como a morfologia do intestino dos peixes. Não foram
649 observadas diferenças significativas ($P>0,05$) no desempenho zootécnico entre os
650 tratamentos. Foram significativamente maiores as proporções de quantidades de
651 linfócitos (%) no sangue, assim como foi observada uma maior expressão fenotípica nos
652 linfócitos CD3 e CD4 nos rins dos peixes que se alimentaram com ração contendo alho.
653 Os monócitos, trombócitos, relação N:L foram significativamente maiores nos peixes
654 que se alimentaram da ração sem alho. Na morfometria do intestino foi observado que a
655 altura das vilosidades e número de vacúolos na porção média dos peixes que se
656 alimentaram da ração com inclusão de alho foram maiores, quando comparado ao
657 tratamento controle. Nossos resultados indicam que a adição de 1% de alho na ração de
658 juvenis de *R. Canadum* estimula o sistema imunológico, assim como beneficia a
659 morfologia do intestino de juvenis do bijupirá proporcionando uma maior capacidade
660 absorptiva dos peixes.

661

662 **Palavras-chaves:** alimentação, imunologia, piscicultura marinha.

663

664 **ABSTRACT**

665 The aim of the present study was evaluated by the effect of the inclusion of garlic in the
666 *Rachycentron canadum* juvenile ration. The juveniles (N = 40 per tank, total N = 120
667 per treatment), with ~ 170 g and 30 cm were submitted to two treatments: inclusion of
668 1% garlic in the diet and control treatment (without addition of garlic). The
669 experimental period lasted 68 days and the fish were fed twice a day. At the end of the
670 experimental period, the zootechnical performance, hematological and immunological
671 parameters, as well as the fish intestinal morphology were evaluated. There were no
672 significant differences ($P> 0.05$) in the zootechnical performance between treatments.
673 The proportions of lymphocytes (%) in the blood were significantly higher, as was a
674 higher phenotypic expression in the CD3 and CD4 lymphocytes in the kidneys of the

675 fish that were fed feed with garlic. Monocytes, thrombocytes, N:L ratio were
676 significantly higher in fish fed on the diet without garlic. In the morphometry of the
677 intestine, it was observed that the villi height and number of vacuoles in the middle
678 portion of the fish that fed the diet with garlic inclusion were higher when compared to
679 the control treatment. Our results indicate that the addition of 1% garlic in the *R.*
680 *canadum* juvenile ration stimulates the immune system as well as benefits the intestinal
681 morphology of juveniles of the cobia, providing a greater absorptive capacity of the
682 fish.

683

684 **Keywords:** Feeding, immunology, marine fish farming.

685

686 INTRODUÇÃO

687 O bijupirá *Rachycentron canadum*, está distribuído em todos os mares tropicais
688 e subtropicais, com excessão da parte central e oriental do Oceano Pacífico. Apenas não
689 é encontrado no Mar Mediterrâneo e na costa leste do Oceano Pacífico (Shaffer &
690 Nakamura, 1989). Várias características confirmam o grande potencial de produção do
691 bijupirá, como elevada fecundidade, facilidade de obtenção de desovas naturais em
692 cativeiro e múltiplas desovas dentro do mesmo período reprodutivo (Arnold *et al.*,
693 2002; Peregrino *et al.*, 2014), rápido crescimento, facilidade de manejo, adaptabilidade
694 a diferentes sistemas produtivos e fácil aceitação de rações comerciais (McLean *et al.*,
695 2009), assim como ampla tolerância a parâmetros de qualidade de água (Santos *et al.*,
696 2012; Sun & Chen, 2014; Rodrigues *et al.*, 2015). A criação desta espécie vem sendo
697 realizada em países asiáticos, e se espalhou para países da Europa, Austrália, Estados
698 Unidos, América Central e do Sul, incluindo o Brasil (Liao *et al.*, 2004; Benetti *et al.*,
699 2010; Cavalli *et al.*, 2011; Sampaio *et al.* 2011; Bezerra *et al.*, 2016). É a única espécie
700 de peixe marinho que vêm sendo criada comercialmente no Brasil, porém como sua
701 produção ainda é incipiente, não há estatísticas oficiais de produção dessa espécie no
702 país. O principal sistema de engorda utilizado para o bijupirá são os tanques-redes, que
703 são instalados em áreas protegidas, como baías e enseadas (Nhu *et al.*, 2011; Sampaio *et*
704 *al.* 2011), ou mesmo em mar aberto (Benetti *et al.*, 2010; Domingues *et al.*, 2014,
705 Bezerra *et al.*, 2016).

706 A aplicação de substâncias com propriedades imunoestimulantes tem sido
707 considerada uma abordagem eficiente no manejo da saúde em peixes na aquicultura,
708 pois são utilizadas para controlar patógenos por meio da ativação do sistema imune

709 (Nya & Austin, 2009). Plantas consideradas medicinais têm sido avaliadas quanto a sua
710 eficácia no sistema imune na produção de peixes (Talpur *et al.*, 2013; Kanani *et al.*,
711 2014; Ribeiro *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). O alho já tem um histórico de aplicações
712 alimentares e medicinais (Ankri & Mirelman, 1999), inclusive com efeitos benéficos
713 nos peixes. Estudos prévios comprovam que o alho atua como imunoestimulante,
714 aumentando a resistência dos peixes a enfermidades, como em trutas arco-íris
715 *Oncorhynchus mykiss* alimentadas com 0,5 e 1% de alho na ração onde foi observado
716 efeito positivo no seu sistema imunológico (Nya & Austin, 2011). Enquanto Talpur &
717 Ikhwanuddin (2012) observaram que barramudis *Lates calcafier* alimentados com ração
718 contendo alho obtiveram maior ganho de peso, taxa de crescimento específico e
719 conversão alimentar em relação aos que se alimentaram apenas de ração sem a inclusão
720 de alho. A adição de alho já foi testada no alimento de juvenis do bijupirá, e confirmada
721 que a suplementação a partir 1,3% de alho reduz a mortalidade dos peixes quando
722 desafiados a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e *Streptococcus iniae* (Guo *et*
723 *al.*, 2015).

724 Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da inclusão de alho na
725 ração de juvenis do *R. canadum* e avaliar seus efeitos no desempenho zootécnico,
726 composição proximal da carcaça, perfil leucocitário e marcações de anticorpos anti-
727 CD3 e anti-CD4 no rim dos peixes, assim como avaliar a morfologia intestinal dos
728 mesmos.

729

730 MATERIAL E MÉTODOS

731 O experimento foi realizado na Maricultura Costa Verde, Ilha Grande, Angra
732 dos Reis – RJ. Os peixes foram adquiridos de um laboratório comercial de produção de
733 juvenis e disponibilizados pela própria Maricultura Costa Verde. O presente estudo foi
734 aprovado pelo comitê de ética em uso animal CEUA-FURG (Pq024/2017).

735

736 *Preparo das rações experimentais*

737 O alho foi descascado, picado e em seguida seco em estufa a 50°C por 48 horas.
738 Após seco, o alho foi triturado em moinho e posteriormente conservado em recipiente
739 vedado e armazenado no freezer a -20°C, de acordo com Esmaili *et al.* (2017). O alho
740 em pó foi incorporado no preparo da ração úmida utilizada na fazenda. Para a
741 preparação da ração o peixe é colocado para cozer durante 1 h (facilitar a mistura da
742 ração). Após o peixe cozido, acrescenta-se ração comercial de 28% de proteína e 8% de

743 lipídios, segundo o protocolo do produtor (1 kg de peixe cozido, 0,7 kg de ração). Nessa
744 etapa são misturados os ingredientes e o alho foi adicionado à ração experimental. A
745 ração foi então processada em moedor (CAF, modelo 22, Brasil) e, posteriormente,
746 ensacada e armazenada em freezer -20 °C até ser administrada aos peixes.

747

748 *Desenho experimental*

749 Os juvenis de bijupirá (~170 g e 30 cm) foram submetidos a dois tratamentos:
750 um tratamento com adição de 1% de alho na ração e um tratamento controle (sem
751 adição de alho). A ração que foi utilizada nesse experimento foi uma ração úmida
752 preparada na própria fazenda. Os peixes foram estocados em 6 tanques-redes de 12 m³,
753 3 tanques-redes para cada tratamento. Foram estocados 40 peixes em cada tanque,
754 totalizando 120 peixes para o controle e 120 peixes para o tratamento. Os bijupirás
755 foram alimentados duas vezes ao dia (7:00 e 16:00 h), durante um período de 68 dias.

756

757 *Análise da Qualidade de Água*

758 As concentrações de oxigênio dissolvido e temperatura da água foram
759 monitoradas diariamente com o auxílio de oxímetro digital (YSI, 550A, EUA).
760 Amostras de água foram coletadas uma vez por semana para aferir a salinidade com
761 refratômetro digital (ATAGO PAL-06S, Japão), o pH com pHmetro de bancada
762 (METTLER TOLEDO 17 Five Easy FE20, Suíça) e a alcalinidade por titulação de
763 acordo com os métodos descritos por Baumgarten *et al.* (2010). Durante o experimento
764 os parâmetros foram mantidos em 22,0 ± 0,8 °C, o oxigênio dissolvido foi de 6,0 ± 0,5
765 mg L⁻¹, a salinidade 35‰, o pH 8,04 ± 0,09 e a alcalinidade 150 mg CaCO₃ L⁻¹.

766

767 *Desempenho Zootécnico*

768 Ao final do período experimental, os peixes foram anestesiados com benzocaína
769 (50 ppm), pesados em balança digital e mensurados com ictiômetro. Foram aferidos os
770 índices zootécnicos: ganho de peso (GP), taxa de conversão alimentar (TCA), taxa de
771 crescimento específico (TCE), fator de condição (K), taxa de eficiência de alimentação
772 (TEA) a ingestão de alimento diário (IAD), consumo aparente (CA) e sobrevivência.
773 Sobrevivência% = 100 × (quantidade final de peixe / quantidade inicial de peixe);

774 GP (%) = (peso final - peso inicial) / (peso inicial);

775 TCA = (alimento consumido) / (ganho de peso);

776 TCE (% por dia) = [ln (peso final) - ln (peso inicial)] / (número de dias);

777 $K = [(\text{peso}) / (\text{comprimento})^3] \times 100;$

778 TEA = ganho de peso / alimento consumido;

779 IAD (% de média GP⁻¹. dia⁻¹) = (ingestão de alimentação) / [(peso final + peso inicial) /
780 2] / dias de teste × 100.

781

782 *Análise de Parâmetros Sanguíneos*

783 Após a biometria final, amostras de sangue foram coletadas por punção pela veia
784 caudal de nove peixes por tratamento (N=3 por repetição), utilizando seringas de 3 mL
785 heparinizadas. Após a coleta foi mensurada a glicemia, com o glicosímetro digital
786 (Accu-Chek Active®, Roche, Alemanha), e o hematócrito com uma centrífuga de
787 micro-hematócrito (Centrifuga Micro-Hematocrito, Rotor 24 Capilares, Modelo H-240,
788 Industria H.T Machinery CO., Taiwan) durante 10 minutos a 16128 × g. Com uma gota
789 de sangue foram realizadas lâminas de esfregaço sanguíneo que foram fixadas com
790 metanol e corados com Giemsa 5%. Posteriormente os leucócitos foram identificados e
791 contados em microscópio óptico (Nikon, Modelo Eclipse E200, Japão). Foram
792 quantificados os linfócitos, monócitos, trombócitos, neutrófilos e outros granulócitos de
793 acordo com Ranzani-Paiva *et al.* (2013). A relação neutrófilos:linfócitos (N:L) foi
794 quantificada de acordo com Zebral *et al.* (2014).

795

796 *Análise Proximal*

797 Foi realizada a análise proximal das rações experimentais (N=3 por ração
798 experimental) e da musculatura dos peixes (3 peixes por repetição; 9 por tratamento) ao
799 final do período experimental. As análises da composição proximal foram realizadas
800 segundo método AOAC (1999), no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos,
801 IO - FURG. A análise da matéria seca (MS) foi realizada em estufa a 102°C por 5 h.
802 Para cinzas (MM), as amostras sofreram uma pré-calcinação e posteriormente levadas à
803 mufla a 600°C por 5 h. A análise de proteína bruta (PB) foi realizada de acordo a
804 metodologia de Kjeldahl. Onde ocorre à digestão prévia das amostras e posteriormente a
805 destilação e titulação do nitrogênio, multiplicando-se o resultado por 6,25. O valor de
806 extrato etéreo (EE) foi obtido com o uso do método de extração a quente, pelo extrator
807 de Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo como solvente, por 5 h.

808

809 *Análise Histológica e Imunohistoquímica*

810 Após a coleta de sangue os peixes foram eutanasiados em imersão benzocaína
811 (500 ppm). Foram coletados os intestinos de juvenis (N=3 por tanque, sendo N=9 por
812 tratamento) e foram analisados: a parte média do intestino dos organismos, nos níveis
813 de tratamento e controle, como forma de avaliar possíveis alterações morfológicas
814 influenciadas pelo tratamento ao qual foram submetidos em comparação ao controle.

815 O material foi fixado em formol a 10% tamponado, posteriormente processado
816 em processador automático (LUPE PT 05, Brasil), embocado em Paraplast e cortado
817 em seções 5 μ de espessura em micrótomo (LUPETEC MRPO3, Brasil). As lâminas
818 foram coradas em hematoxilina-eosina. As lâminas foram observadas em microscópio
819 (Zeis Primo Star) no aumento 10x. Foram selecionados dez campos na lâmina e foram
820 mensuradas a altura das vilosidades, altura da dobra (10 medidas por peixe, 3 peixes por
821 tanque) e número de vacúolos (10 campos por peixe, 3 peixes por tanque).

822 Na imunohistoquímica dos rins foram utilizados os mesmos animais processados
823 para as análises histológicas. Os rins coletados foram fixados em formol tamponado a
824 20% e, posteriormente, processado em processador automático (PT05, LUPETEC,
825 Brasil), incluídos em Paraplast e cortado em seções 5- μ de espessura em micrótomo
826 (MRPO3, LUPETEC, Brasil). Sendo marcados de acordo com a metodologia ABC
827 peroxidase (Vectastain Elite ABC Kit, Canada), descrita por Hsu *et al.* (1981). A
828 imunohistoquímica foi realizada com anticorpos monoclonais anti-Cd3 (Sigma®, USA)
829 e anti-Cd4 (Dako, Argentina). Os cortes histológicos foram lavados (0.1%
830 diaminobenzidina), desidratadas e coradas com hematoxilina para sua posterior
831 avaliação.

832 Avaliação dos receptores CD3 e CD4 se fez por análise quantitativa da
833 porcentagem da expressão fenotípica por 100 milímetros quadrado de tecido. A
834 expressão dos receptores CD3 e CD4, mediante as análises morfométricas, foi
835 quantificada utilizando o software Bioscan OPTIMAS® 6.1 (Romano *et al.*, 1996).

836

837 *Análise Estatística*

838 Os dados obtidos foram submetidos a teste de normalidade de Kolmogorov &
839 Smirnov e teste de homocedasticidade com teste de Levene e analisados utilizando teste
840 T - Student (P<0,05). Os valores percentuais serão transformados (arco-seno da raiz
841 quadrada) antes de serem analisados. Todos os dados estão expressos em média \pm
842 desvio padrão.

843

844 **RESULTADOS**

845 Os parâmetros de sobrevivência e crescimento não apresentaram diferença
846 significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos. Contudo, o consumo de ração nos peixes
847 alimentados com suplementação de alho foi superior ($P<0,05$) aos peixes alimentados
848 sem suplementação (Tabela 1).

849 Tabela 1: Parâmetros zootécnicos (média \pm DP) de juvenis de bijupirá *Rachycentron*
850 *canadum* alimentados com ração com inclusão de alho e sem inclusão. Letras diferentes
851 apresentam diferenças significativas ($P<0,05$) entre os tratamentos após análise T-
852 Student.

Parâmetro	Sem Alho	Com Alho
Comprimento Total Inicial (cm)	30,8 \pm 0,64	31,5 \pm 0,32
Comprimento Total Final (cm)	34,0 \pm 0,67	34,4 \pm 0,1
Peso Inicial (g)	176,0 \pm 16,0	167,0 \pm 25
Peso Final (g)	318,0 \pm 3,92	327 \pm 5,54
Biomassa Inicial (g)	7050 \pm 632	6683 \pm 994
Biomassa Final (g)	12620 \pm 204	12663 \pm 289
Consumo alimentar (%)	4,0 \pm 0,2 ^b	5,0 \pm 0,3 ^a
Ganho de Peso (%)	80 \pm 16,81	93 \pm 34,31
TCE (% ganho de peso/dia)	0,86 \pm 0,14	0,95 \pm 0,25
CAA	4,90 \pm 0,63	5,52 \pm 1,0
Eficiência alimentar (%)	44 \pm 5,4	47 \pm 8,6
Fator de Condição (K)	0,8 \pm 0,03	0,8 \pm 0,016
Sobrevivência (%)	99 \pm 1,44	97 \pm 3,81

853 ¹TCE: Taxa de Crescimento Específico. ²CAA: Conversão Alimenatar Aparente.

854 O número de linfócitos observados foi superior no tratamento com adição de
855 alho quando comparado aos peixes alimentados sem adição de alho. No entanto, o
856 número de monócitos, trombócitos e a relação N:L foram superiores ($P<0,05$) nos
857 peixes alimentados sem alho quando comprado ao grupo alimentado com alho (Tabela
858 2). Com relação à glicose e ao hematócrito estes não apresentaram diferenças
859 significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos.

860

861 Tabela 2: Parâmetros hematológicos de bijupirá alimentos com ração suplementada com
862 alho e sem inclusão de alho. Letras diferentes apresentam diferenças significativas
863 ($P<0,05$) entre os tratamentos após análise T-Student.

Parâmetros Hematológicos	Sem Alho	Com Alho
Monócitos (%)	5,9 ± 0,0043 ^a	2,6 ± 0,0023 ^b
Linfócitos (%)	82,0 ± 0,0019 ^b	89,6 ± 0,0093 ^a
Neutrófilos e Outros Granulócitos (%)	4,8 ± 0,0076	3,4 ± 0,0068
Trombócitos (%)	7,2 ± 0,0091 ^a	2,7 ± 0,0011 ^b
Relação N:L	0,059 ± 0,0092 ^a	0,038 ± 0,0079 ^b
Glicose	41,0 ± 9,27	45,9 ± 17,57
Hematócrito	31,7 ± 5,12	29,0 ± 8,57

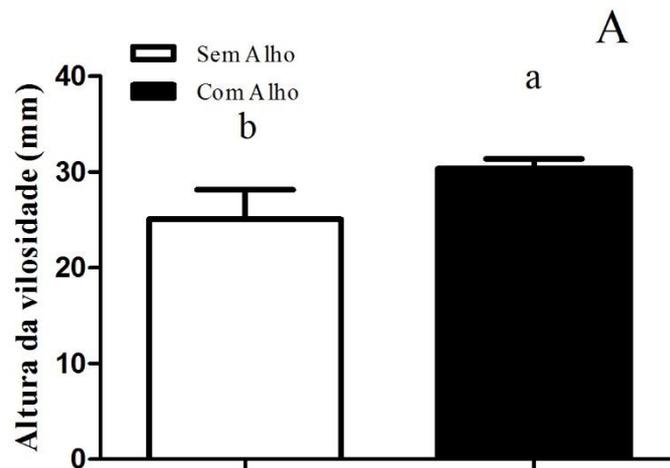
864 Para a composição proximal da ração úmida foi observada diferença
865 significativa no teor de proteínas e cinzas entre os tratamentos, sendo significativamente
866 superior no tratamento com adição de alho comparado ao tratamento sem adição de
867 alho. No entanto na composição proximal dos peixes não foram observadas diferenças
868 significativas ($P > 0,05$) (Tabela 3).

869

870 Tabela 3: Média (\pm DP) da composição proximal (g.kg^{-1}) ração úmida sem alho e com
871 alho utilizada durante o experimento e do músculo de bijupirá (*Rachycentron canadum*),
872 após 68 dias alimentados com ração suplementada com alho e sem suplementação com
873 alho. Letras diferentes apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os
874 tratamentos após análise T-Student.

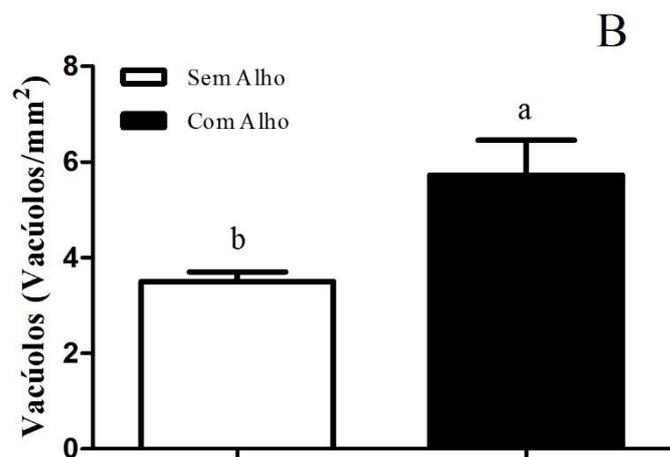
	Tratamento	Proteína (%)	Lipídio (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
Ração	Sem Alho	41,69 ± 1,25 ^b	6,58 ± 1,90	7,31 ± 0,36 ^b	45,58 ± 1,06
	Com Alho	43,93 ± 0,54 ^a	8,20 ± 1,32	8,81 ± 0,19 ^a	42,98 ± 2,00
Peixe	Sem Alho	20,43 ± 1,77	9,43 ± 1,14	0,94 ± 0,04	75,22 ± 1,66
	Com Alho	21,06 ± 1,04	9,40 ± 1,41	0,96 ± 0,03	74,86 ± 1,20

875 A altura das vilosidades e a quantidade de vacúolos foram maiores nos bijupirás
876 alimentados com alho em relação ao bijupirás do controle. Sendo observadas diferenças
877 significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Figura 5).



878

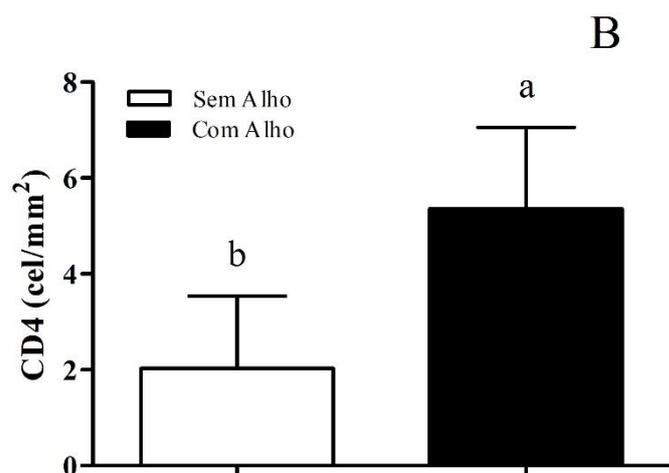
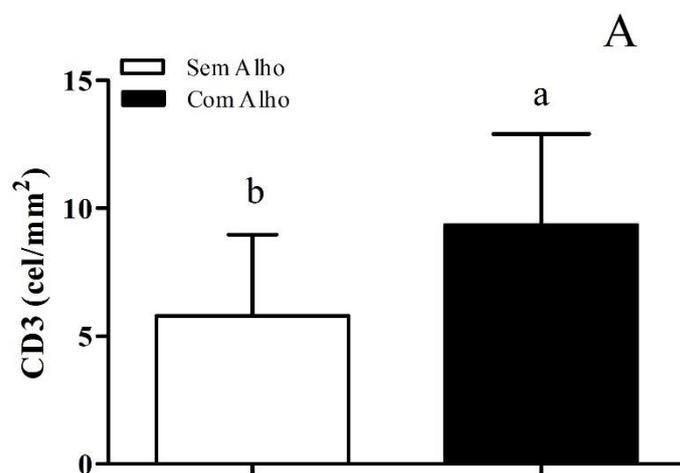
879



880

881 Figura 5: Média (\pm DP) da altura das vilosidades (A) e do número de vacúolos (B) na
 882 porção média do intestino de juvenis de bijupirás alimentados com suplementação de
 883 alho e sem suplementação com alho. Letras diferentes apresentam diferenças
 884 significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos após análise t-Student.

885 A expressão fenotípica dos receptores linfocitários CD3 e CD4 nos rins dos
 886 juvenis de bijupirás alimentados com alho foi significativamente superior ($P < 0,05$) aos
 887 alimentados sem suplementação (Figura 6).



888

889

890 Figura 7: Expressão fenotípica de CD3 (A) e CD4 (B) no rim de juvenis de bijupirá
 891 alimentados com suplementação de alho e sem suplementação com alho. Dados são
 892 expressos em média \pm DP. Letras diferentes apresentam diferenças significativas
 893 ($P < 0,05$) entre os tratamentos após análise T-Student.

894

895 DISCUSSÃO

896 A inclusão de alho na ração em peixes pode melhorar o crescimento de
 897 diferentes espécies, como demonstrado para a truta arco-íris (Esmielli *et al.*, 2017;
 898 Büyükdeveci *et al.*, 2018), o bijupirá (Guo *et al.*, 2015), barramudi (Talpur &
 899 Ikhwanuddin, 2012) e para o “Sobaity seabream” *Sparidentex hasta* (Jahanjoo *et al.*,
 900 2018). No entanto, se adicionado em grandes concentrações, pode causar redução na
 901 ingestão de ração devido ao seu odor desagradável e redução da palatabilidade do
 902 alimento (Inoue *et al.*, 2016), tendo como consequência um menor crescimento nos

903 peixes. No presente estudo, a inclusão de 1% alho não afetou a palatabilidade da ração,
904 pois foi observado um maior consumo da ração com adição de alho. Resultado
905 semelhante foi observado em juvenis de *L. calcarifer*, que apresentaram um maior
906 consumo de ração com suplementação de alho de até 15% na ração (Militiz *et al.*,
907 2013), e para juvenis de tambaqui *Collossoma macropomum* que foram alimentados com
908 até 4,5% de alho na ração (Inoue *et al.*, 2016). Contudo, esse maior consumo de ração
909 não se refletiu em maior crescimento dos peixes no presente estudo, não apresentando
910 diferenças significativas entre os tratamentos. Martins *et al.* (2002) também não
911 observou diferença significativa no crescimento do pacu *Piaractus mesopotamicus* que
912 se alimentaram com alho. A inclusão de 1% de alho na ração de esturjão-branco *Huso*
913 *huso* também não afetou o crescimento (Kanani *et al.*, 2014). Não foi observado efeito
914 no peso final, ganho de peso, taxa de crescimento específica e conversão alimentar de
915 bagre-africano *Clarias gariepinus* alimentadas com até 1,5% de casca de alho
916 (Thanikachalam *et al.*, 2010).

917 Por outro lado, a adição de alho apresentou benefícios a morfologia intestinal
918 dos peixes. O aumento das vilosidades intestinais e o aumento do número dos vacúolos
919 é um indicativo da melhor capacidade absorptiva dos peixes (Cheng *et al.*, 2011). Dessa
920 forma, os resultados observados na análise histológica do presente estudo demonstram
921 uma melhor capacidade absorptiva dos peixes, que inclusive aumentaram o consumo de
922 ração. Este é o primeiro estudo que mostra esses efeitos no intestino de peixes
923 alimentados com alho. Estudos recentes mostram que a adição de alho promove
924 mudanças na microbiota intestinal de peixes (Büyükdeveci *et al.*, 2018) o que pode
925 também estar relacionada a mudança morfológica do intestino e estar indicando uma
926 melhora da capacidade absorptiva dos nutrientes da ração.

927 Os linfócitos estão relacionados ao reconhecimento de antígenos e pela
928 organização da resposta do sistema imune dos peixes (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013),
929 sendo que o estresse em peixes pode causar linfopenia nos mesmos (Hrubec & Smith
930 2010). Enquanto, de acordo com Clauss *et al.* (2008), peixes podem apresentar como
931 resposta inflamatória um aumento do número de monócitos circulantes (monocitose).
932 No presente estudo foi observado um aumento na proporção de linfócitos com uma
933 redução na proporção de monócitos nos peixes alimentados com a ração contendo alho,
934 indicando uma estimulação do sistema imune dos peixes Resultado semelhante foi
935 observado em *O. mykiss* alimentadas com ração suplementada com alho entre 0,025 e
936 1% (Nya & Austin, 2009). Fazlolahzadeh *et al.* (2011) observou maiores proporções de

937 linfócitos em trutas arco-íris que foram alimentadas com inclusão de alho na ração de
938 entre 2 e 4%.

939 Os trombócitos são leucócitos que participam da defesa orgânica, principalmente
940 na coagulação sanguínea (Hine, 1992; Grant, 2015). Porém, também realizam a
941 fagocitose, em particular na remoção de vestígios de células ou tecidos mortos ou
942 danificados (Tavares-Dias *et al.*, 2007), portanto o aumento desse leucócito na
943 circulação é uma resposta dos peixes, pois pode indicar um aumento de fagocitose de
944 células que podem estar sendo afetadas pela presença de algum patógeno ou parasita. O
945 aumento da proporção de trombócitos no sangue, também foi observado em juvenis do
946 barramundi alimentados com inclusão de 1% de alho na ração (Talpur & Ikhwanuddin,
947 2012).

948 Os peixes quando expostos a uma situação de estresse podem apresentar
949 linfopenia (Valenzuela *et al.*, 2008; Rijn & Reina 2010), portanto a relação N:L pode
950 ser utilizada como índice de uma resposta de estresse secundário em peixes (Davis *et*
951 *al.*, 2008). Dessa forma a redução da relação N:L observada no grupo alimentado com
952 alho pode ser um indicativo de redução de estresse dos peixes sustentada pela ativação
953 do sistema imunológico dos peixes. A relação N:L foi utilizada por Zebreal *et al.* (2014),
954 onde o aumento dessa relação foi observada com o aumento da densidade de estocagem
955 na criação de juvenis do peixe-rei *Odontesthes bonariensis*, afirmando que o aumento
956 da densidade gera um incremento no estresse na produção dessa espécie.

957 Em bijupirás é possível observar a presença de linfócitos com os marcadores
958 CD3⁺ nos rins a partir do oitavo dia após a eclosão (dae), enquanto linfócitos com os
959 marcadores CD4⁺ são observados a partir do décimo terceiro dae, confirmado à
960 capacidade de memória imunológica nessa espécie a partir do 13º dae (Klosterhoff *et*
961 *al.*, 2015). Então a partir do décimo terceiro dae é possível a utilização de vacinas ou
962 substâncias que melhorem o sistema imune no bijupirá. A utilização de alho em criação
963 de peixes pode ser uma prática a ser adotada para melhorar a atividade do sistema
964 imune, conferindo proteção contra doenças (Nya & Austin, 2011; Inoue *et al.*, 2016).
965 Portanto, a maior expressão desses marcados observados no presente estudo indicam
966 uma maior ativação do sistema imunológico dos peixes alimentados com alho.

967 Durante o período de inverno, os peixes reduzem a ingestão de alimento e
968 conseqüentemente ficam expostos a uma situação de estresse devido a redução dessa
969 temperatura (Sun & Chen, 2014). Como medida para atenuar o estresse durante o
970 período de inverno é recomendado a utilização de substâncias imunoestimulantes na

971 alimentação dos peixes (Barros *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2018). O presente estudo foi
972 realizado durante o período de inverno na região sudeste do Brasil, onde a água
973 permaneceu em 22°C, uma temperatura bem reduzida quando comparada a temperatura
974 ideal para crescimento do bijupirá que fica entre 27 e 33°C (Sun & Chen, 2014). Dessa
975 forma, em uma condição de inverno o alho demonstrou benefícios ao sistema
976 imunológico dos peixes com diminuição da condição de estresse dos peixes. A inclusão
977 de 1% de alho na ração não mostrou influência no crescimento de juvenis do bijupirá,
978 porém estimulou o sistema imunológico, aumentando as vilosidades e números de
979 vacúolos no intestino, proporcionando uma maior capacidade absorptiva de juvenis do
980 bijupirá criados no período do inverno. Portanto é recomendado a utilização de 1% de
981 alho na alimentação de juvenis do bijupirá.

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000

1001

1002

1003

1004

1005 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1006 ANKRI, S., MIRELMAN, D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic.
1007 *Microbes and Infection* 2: 125–129.
- 1008 AOAC. 1999. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical
1009 Chemists, 16th ed. Washington, DC, USA.
- 1010 ARNOLD, C.R., KAISER, J.B., HOLT, G.J., 2002. Spawning of cobia *Rachycentron*
1011 *canadum* in captivity. *Journal World Aquaculture Society* 33: 205–208.
- 1012 BARROS, M.M., FALCON, D.R., ORSI, R.O., PEZZATO, L.E., FERNANDES, A.C.,
1013 GUIMARÃES, I.G., FERNANDES, A., PADOVANI, C.R., SARTORI, M.M.P.
1014 2014. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed
1015 β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial
1016 challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 39: 188-195.
- 1017 BAUMGARTEN, M.G.Z., ROCHA, J.M.B., NIENCHESKI, L.F.H. 2010. Manual de
1018 Análises em Oceanografia Química. Editora da FURG. Rio Grande, RS. 172p.
- 1019 BENETTI, D.D.; O'HANLON, B.; RIVERA, J.A.; WELCH, A.W.; MAXEY, C.;
1020 ORHUN, M.R. 2010 Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in
1021 open ocean submerged cages in the Caribbean. *Aquaculture*: 302: 195-201.
- 1022 BEZERRA, T.R.Q., DOMINGUES, E.C., FILHO, L.F.A.M., ROMBENSO, A.N.,
1023 HAMILTON, S., CAVALLI, R.O. 2016. Economic analysis of cobia (*Rachycentron*
1024 *canadum*) cage culture in large- and small-scale production systems in Brazil.
1025 *Aquaculture Internacional* 24(2): 609-622.
- 1026 BÜYÜKDEVECI, M.E., BALCÁZAR, J.L., DEMIRKALE, I., DIKEL, S. 2018.
1027 Effects of garlic-supplemented diet on growth performance and intestinal microbiota
1028 of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 486: 170-174.
- 1029 CAVALLI, R.O., DOMINGUES, E.C., HAMILTON, S. 2011. Desenvolvimento da
1030 produção de peixes marinhos em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios.
1031 *Revista Brasileira Zootecnia* 40: 151-164.
- 1032 CHENG, Z.Y., BUENTELLO, A., GATLIN III, D.M., 2011. Dietary nucleotides
1033 influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops*
1034 *ocellatus*. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 143–147.
- 1035 CHENG, C., LIANG, H., LUO, S., WANG, A., YE, C. 2018. The protective effects of
1036 vitamin C on apoptosis, DNA damage and proteome of pufferfish (*Takifugu*
1037 *obscurus*) under low temperature stress. *Journal of Thermal Biology* 71: 128-135.

- 1038 CLAUSS, T.M., DOVE, A.D., ARNOLD, J.E. 2008. Hematologic disorders of fish.
1039 Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice 11: 445–62.
- 1040 DAVIS, A.K., MANEY D.L., MAEZ J.C. (2008) The use of leukocyte profiles to
1041 measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Functional Ecology 22: 760–
1042 772.
- 1043 DOMINGUES, E.C., HAMILTON, S., BEZERRA, T.R.Q., CAVALLI, R.O. 2014.
1044 Viabilidade econômica da criação do beijupirá em mar aberto em Pernambuco.
1045 Boletim do Instituto de Pesca 40: 237–249.
- 1046 ESMAEILI, M., KENNARI, A., ROMBENSO, A. N. 2017. Effects of fish meal
1047 replacement with meat and bone meal using garlic (*Allium sativum*) powder on
1048 growth, feeding, digestive enzymes and apparent digestibility of nutrients and fatty
1049 acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). Aquaculture
1050 Nutrition 23: 1225-1234.
- 1051 FAZLOLAHZADEH, F., KERAMATI, K., NAZIFI, S., SHIRIAN, S., SEIFI, S. 2011.
1052 Effect of Garlic (*Allium sativum*) on Hematological Parameters and Plasma
1053 Activities of ALT and AST of Rainbow trout in Temperature Stress. Australian
1054 Journal of Basic and Applied Sciences 5(9): 84-90.
- 1055 GRANT, K.R. 2015. Fish Hematology and Associated Disorders. Veterinary Clinics of
1056 North America: Exotic Animal Practice 18: 83–103.
- 1057 GUO, J. J.; KUO, C. M.; HONG, J. W.; CHOU, R. L.; LEE, Y. H.; CHEN, T. I. 2015
1058 The effects of garlic supplemented diets on antibacterial activities against
1059 *Photobacterium damsela* subsp. Piscicida and *Streptococcus iniae* and on growth in
1060 *Cobia*, *Rachycentron canadum*. Aquaculture 435: 111 – 115.
- 1061 HINE, P.M. 1992. The granulocytes of fish. Fish Shellfish Immunology 2. 79-88.
- 1062 HRUBEC, T.C., SMITH, S.A. Hematology of fishes. In: WEISS, D.J., WARDROP,
1063 K.J. Schalm's veterinary hematology. 6 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. Cap.
1064 126. p. 994-1004.
- 1065 HSU, S., RAINE, L., FANGER, H. 1981. Use of Avidin- Biotin-Peroxidase Complex
1066 (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: a comparison between ABC and unlabeled
1067 antibody (PAP) procedures. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 29: 577-
1068 580.
- 1069 INOUE, L.A.K.A., MACIEL, P.O., AFFONSO, E.G., BOIJINK, C.L., TAVARES-
1070 DIAS, M. 2016. Growth, parasitic infection and hematology in *Colossoma*

1071 *macropomum* Cuvier, fed diets containing *Allium sativum*. Journal Applied
1072 Ichthyology 32: 901-905.

1073 JAHANJOO, V., YAHYAVI, M., AKRAMI, R., BAHRI, A.H. 2018. Influence of
1074 Adding Garlic (*Allium sativum*), Ginger (*Zingiber officinale*), Thyme (*Thymus*
1075 *vulgaris*) and Their Combination on the Growth Performance,
1076 HaematoImmunological Parameters and Disease Resistance to *Photobacterium*
1077 *damselae* in Sobaity Sea Bream (*Sparidentex hasta*) Fry. Turkish Journal of Fisheries
1078 and Aquatic Sciences 18: 633-645.

1079 KANANI, H.G., NOBAHAR, Z., KAKOOLAKI, S., JAFARIAN, H. 2014. Effect of
1080 ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological
1081 parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. Fish Physiology and
1082 Biochemistry 40: 481-490.

1083 KLOSTERHOFF, M.C., PEREIRA, J., RODRIGUES, R.V., GUSMÃO, E.P.,
1084 SAMPAIO, L.A., TESSER, M.B., ROMANO, L.A. 2015. Ontogenic development of
1085 kidney, thymus and spleen and phenotypic expression of CD3 and CD4 receptors on
1086 the lymphocytes of cobia (*Rachycentron canadum*). Annals of the Brazilian
1087 Academy of Sciences 87(4): 2111-2121.

1088 LIAO, I.C., HUANG, T.S., TSAI, W.S., HSUEH, C.M., CHANG, S.L., LEAÑOS,
1089 E.M. 2004. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. Aquaculture 237:
1090 155-165.

1091 NHU, V.C., NGUYEN, H.Q., LE, T.L., TRAN, M.T., SORGELOOS, P.,
1092 DIERCKENS, K., SVENNEVIG, N. 2011. Cobia *Rachycentron canadum*
1093 aquaculture in Vietnam: Recent developments and prospects. Aquaculture 315(1-2):
1094 20-25.

1095 NYA, E.J., AUSTIN, B. 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas*
1096 *hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of
1097 Fish Diseases 32: 963–970.

1098 NYA, E.J., AUSTIN, B. 2011. Development of immunity in rainbow trout
1099 (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary
1100 application of garlic. Fish & Shellfish Immunology 30: 845-850.

1101 MARTINS, M.L., MORAES, F.R., MIYAZAKI, D.M.Y., BRUM, C.D., ONAKA,
1102 E.M., FENERICK Jr, J., BOZZO, F.R. 2002. Alternative Treatment for
1103 *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylodyridae) Infection in Cultivated

- 1104 Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and its
1105 Haematological Effects. *Parasite* 9(2): 175-180.
- 1106 MCLEAN, E., SALZE, G., SCHAWARZ, M.H., CRAIG, S.R. 2009. Cobia cultivation,
1107 in: Burnell, G., Allan, G. (Eds.), *New Technologies in aquaculture: Improving*
1108 *production efficiency, quality and environmental management*. CRC Press, Boca
1109 Raton. 804-821.
- 1110 MILITZ, T.A., SOUTHGATE, P.C., CARTON, A.G., HUTSON, K.S. 2013. Dietary
1111 supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent monogenean infection in
1112 aquaculture. *Aquaculture* 408-409: 95-99.
- 1113 PEREGRINO, R.B., HAMILTON, S., DOMINGUES, E.C., MANZELLA, J.C.,
1114 HAZIN, F.H.V., CAVALLI, R.O. 2014. Desempenho reprodutivo do beijupirá
1115 (*Rachycentron canadum*) capturado no litoral de Pernambuco. *Arquivo Brasileiro de*
1116 *Medicina Veterinária e Zootecnia* 66(3): 681-687.
- 1117 RANZANI-PAIVA, M.J.T., PÁDUA, S.B., TAVARES-DIAS, M., EGAMI, M.I. 2013.
1118 Métodos para análise hematológica em peixes. *EDUEM*. 140 p.
- 1119 RIBEIRO, S.C, CASTELO, A.S., SILVA, B.M.P., CUNHA, A.S., PROIETTI JÚNIOR,
1120 A.A., OBA-YOSHIOKA, E.T. 2016. Hematological responses of tambaqui
1121 *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with
1122 essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas*
1123 *hydrophila*. *Acta Amazonica* 46: 99-106.
- 1124 RIJIN, J.V., REINA, R.D. 2010. Distribution of leukocytes as indicators of stress in the
1125 Australian swellshark, *Cephalos cyllium laticeps*. *Fish & Shellfish Immunology* 29:
1126 534–538.
- 1127 RODRIGUES, R.V., PEDRON, J.P. ROMANO, L.A., TESSER, M.B., SAMPAIO,
1128 L.A. 2015. Acute responses of juvenile cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus
1129 1766) to acid stress. *Aquaculture Research* 46(5): 1241-1247.
- 1130 ROMANO, L.A., FERDER, M.D., STELLA, I.Y., INSERRA, F., FERDER, L. 1996.
1131 High correlation in renal tissue between computed image analysis and classical
1132 morphometric analysis. *Journal Histotechnology* 19: 121- 123.
- 1133 SAMPAIO, L. A., MOREIRA, C. B., MIRANDA-FILHO, K. C., ROMBENSO, A. N.
1134 2011. Culture of cobia *Rachycentron canadum* (L) in near-shore cages off the
1135 Brazilian coast. *Aquaculture Research* 42: 832 – 834.
- 1136 SANTOS, R.A., BIANCHINI, A., JORGE, M.B., ROMANO, L.A., SAMPAIO, L.A.,
1137 TESSER, M.B. 2014. Cobia *Rachycentron canadum* L. reared in low-salinity water:

1138 does dietary sodium chloride affect growth and osmoregulation?. *Aquaculture*
1139 *Research* 45: 728–735.

1140 SHAFFER, R.V., NAKAMURA, E. L. 1989. Synopsis of biological data on the cobia
1141 *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). Washington, D.C: FAO Fisheries
1142 Synopsis.153 (National Marine Fisheries Service/S 153), U.S. Department of
1143 Commerce, NOAA Technical Report, National Marine Fisheries Service 82.

1144 SUN, L., CHEN, H. 2014. Effects of water temperature and fish size on growth and
1145 bioenergetics of cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 426-427: 172-180.

1146 TALPUR, A.D., IKHWANUDDIN, M. 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*)
1147 on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance
1148 against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch).
1149 *Aquaculture* 364-365: 6–12.

1150 TALPUR, A.D., IKHWANUDDIN, M., BOLONG, A.A. 2013. Nutritional effects of
1151 ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates*
1152 *calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 400-
1153 401: 46-52.

1154 TAVARES-DIAS, M., ONO, E.A., PILARSKI, F., MORAES, F.R. 2007. Can
1155 thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of
1156 teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *Journal of Applied*
1157 *Ichthyology* 23: 709-712.

1158 THANIKACHALAM, K., KASI, M., RATHINAM, X. 2010. Effect of garlic peel on
1159 growth, hematological parameters and disease resistance against *Aeromonas*
1160 *hydrophila* in African catfish *Clarias gariepinus* (Bloch) fingerlings. *Asian Pacific*
1161 *Journal of Tropical Medicine* 3(8): 614–618.

1162 VALENZUELA, A.E., SILVA, V.M., KLEMPAU, A.E. 2008. Effects of different
1163 artificial photoperiods and temperatures on haematological parameters of rainbow
1164 trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* 34: 159–167.

1165 WU, Y., CHEN, Y., UENG, P. NAN, F. 2016. Effects of medicinal herbs “*Plantago*
1166 *asiatica*”, “*Houttuynia cordata*” and “*Mentha haplocalyx*” on non-specific immune
1167 responses of cobia (*Rachycentron canadum*). *Fish & Shellfish Immunology* 58: 406-
1168 414.

1169 ZEBRAL, Y.D., ZAFALON-SILVA, B., MASCARENHAS, M.W., ROBALDO, R.B.
1170 2014. Leucocyte profile and growth rates as indicators of crowding stress in pejerrey
1171 fingerlings (*Odontesthes bonariensis*). *Aquaculture Research* 46(9): 2270-2276.

1172 **CONCLUSÃO FINAL**

1173 A inclusão de 1% de alho na ração não mostrou efeito no crescimento de juvenis
1174 do bijupirá, porém foi observado estimulação do sistema imunológico, aumentando as
1175 vilosidades e números de vacúolos no intestino, proporcionando uma maior capacidade
1176 absorptiva de juvenis do bijupirá criados no período do inverno. Portanto é recomendado
1177 a utilização de 1% de alho na alimentação de juvenis do bijupirá.