

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
PESQUEIRAS NOS TRÓPICOS

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber*
***officinale* FRENTE *Aeromonas hydrophila*, PATÓGENO DE**
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

PATRÍCIA CASTRO MONTEIRO

MANAUS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
PESQUEIRAS NOS TRÓPICOS

PATRÍCIA CASTRO MONTEIRO

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber*
***officinale* FRENTE *Aeromonas hydrophila*, PATÓGENO DE**
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Pesqueiras, área de concentração Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais

Orientador: Dra. Edsandra Campos Chagas

Coorientador: Dra. Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M775p Monteiro, Patrícia Castro
Potencial antibacteriano dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*,
Ocimum gratissimum e *Zingiber officinale* frente *Aeromonas*
hydrophila, patógeno de tambaqui (*Colossoma macropomum*) /
Patrícia Castro Monteiro. 2019
CXXXII f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Edsandra Campos Chagas
Coorientadora: Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan
Tese (Doutorado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Óleos essenciais . 2. Testes in vitro. 3. Banhos terapêuticos. 4.
Suplementação dietária. I. Chagas, Edsandra Campos II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

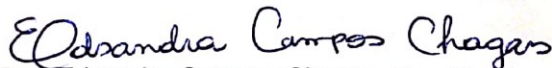
PATRÍCIA CASTRO MONTEIRO

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* FRENTE *Aeromonas hydrophila*, PATÓGENO DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

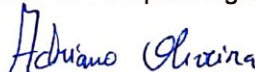
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, área de concentração em Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais.

Aprovada em 30 de agosto de 2019

BANCA EXAMINADORA



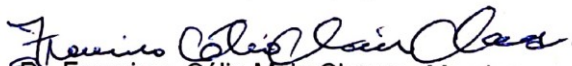
Dra. Edsandra Campos Chagas- Presidente
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA



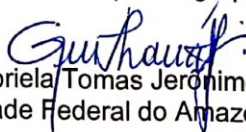
Dr. Adriano Teixeira de Oliveira- Membro
Instituto Federal do Amazonas - IFAM



Dra. Fernanda de Alexandre Sebastião - Membro
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA



Dr. Francisco Célio Maia Chaves- Membro
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA



Dra. Gabriela Tomas Jerônimo - Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

AGRADECIMENTOS

Minha maior gratidão sem dúvida alguma é a Deus, o responsável por todas minhas conquistas pessoais e profissionais, o que me fez superar o que em alguns momentos julguei insuperável, devolvendo-me o brio quando pensei que o tinha perdido e, o mais importante de tudo, me tornou uma mulher forte, independente e capaz de transformar meus sonhos em realidade.

Aos meus pais Luiz Monteiro e Ana Prestes por todos os ensinamentos, amor, dedicação e principalmente cuidado em todos os momentos de minha vida, juntamente a minha irmã Anne Karollynne Monteiro.

A minha orientadora Dra. Edsandra Campos Chagas por compartilhar sua experiência e sempre se fazer presente e prestativa ao logo desses quatro anos, não medindo esforços em suas contribuições durante todas as coletas e elaboração desta tese, serei eternamente grata aos seus ensinamentos.

A minha coorientadora Dra. Fernanda O'Sullivan por todo apoio e incentivo.

A Embrapa Amazônia Ocidental por toda infraestrutura concedida, juntamente a toda equipe que me ajudou incansavelmente em todas as fases deste trabalho, Cláudia Majolo, Franmir Brandão, Caio Francisco Farias, Irani Morais, Juliete Rocha, Jony Dairiki, Maria Inês Braga, Lorena Matos, Ana Maria Souza, Damy Caroline, Daniel Silva, Marcondes, Edson, Francisco Célio Chaves e Marcelo Róseo.

À FAPEAM pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq pelo financiamento deste estudo.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, local onde aprendi e conheci pessoas maravilhosas, Robson, Samantha, Ariane, Daniel, José, Juliete e aos demais, os momentos de estudo, correria e risadas jamais serão esquecidos.

A Dra. Kedma Yamamoto, a melhor “chefinha” do curso de pós-graduação do CIPET, meu eterno respeito, carinho e admiração por sua simplicidade, humildade e atenção.

A Antônia secretária do curso, por sua disponibilidade e atenção.

Aos meus mais que amigos, os que me deram todo suporte emocional e que jamais soltaram a minha mão, cada palavra de incentivo e até mesmo puxões de orelha foram essenciais, Márcio Quara, Halison Santos, Evellyn Castro, Natalia Melo, Wal Silva, Fábio Nahmias, Cassiano Fortes e Elenice Brasil, jamais esquecerei cada gesto de carinho e afeto.

As tias Shirley Castro e Nice Melo que sempre me trataram como filha.

À todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram na realização desta etapa de minha vida.

E ao meu boi-bumbá Garantido, que sempre me devolveu o sorriso nas madrugadas em que redigia esta tese e me embalava com suas lindas toadas, vigorando o lado que jamais quero perder, a alegria de uma menina torcedora e apaixonada por sua cultura.

Tá no meu coração, tá no meu linguajar, tá na pele morena, tá no DNA caboclo. Tá no meu guaraná, tá no meu tambaqui, farinha d' água cai bem com tucumã e açaí, bala de cupuaçu, bolo de piracuí, filé de pirarucu, molho de pimenta murupi no tucupi. E a saudade do meu boi-bumbá, só não é maior que o meu rio, que o meu rio Amazonas.
Aonde vou, aonde vou, te levo aonde vou, aonde vou, vou contigo Amazônia.
(Enéas Dias e Márcia Santos)

Sonhos de Ouro

Sonhar

sonhos dourados, sonhos de ouro, doce ambição
a maior aspiração pode se realizar
a gente só tem que no sonho acreditar
vamos sonhar

Sonha comigo

que o futuro desse sonho é Garantido
a garantia está no amor mais verdadeiro
Um mundo novo vem aí
com ele vem a fé da multidão

Nos sonhos

muito dinheiro, mais justiça e mais bondade
todos os homens e mulheres da cidade
fazem cruzada pela paz
negociando o bem em oração

Sonhamos renascer

e mais se pode crer
quando o amor prevalecer
nos corações
a paz é o bem sonhado
confia nos abraços
constrói os resultados
nos valores do povo feliz

(Tadeu Garcia e Silvana Silva)

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OEs) de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* *in vitro* e *in vivo* por meio de banhos terapêuticos e a suplementação na dieta de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e seus efeitos sobre crescimento, parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos após desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*. No capítulo 1 foram realizados os testes *in vitro* frente 10 cepas de *A. hydrophila* isoladas de tambaquis, além de determinar sua composição química. Os principais compostos presentes nos OEs foram timol (76,6%), *p*-cimeno (6,3%) e β -cariofileno (5,0%) para *L. sidoides*, eugenol (43,3%), 1,8-cineole (28,2%) e β -selineno (5,5%) para *O. gratissimum* e geranial (23,2%), neral (16,7%) e 1,8-cineole (15,8%) para *Z. officinale*. Todos os OEs avaliados apresentaram ação bactericida frente 10 cepas de *A. hydrophila*, com concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) variando de 625 a 5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dentre os OEs avaliados, o OE de *L. sidoides* apresentou a melhor atividade antimicrobiana contra as cepas de *A. hydrophila* (CIM e CBM de 625 a 1.250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). No capítulo 2, juvenis de tambaqui foram experimentalmente infectados com *A. hydrophila*, e então submetidos a banhos terapêuticos de 60 minutos durante 5 dias consecutivos. Os tratamentos aplicados foram: 1) controle positivo (infectado com *A. hydrophila* e sem adição de OE), 2) controle negativo (infectado com *A. hydrophila* e adição de 10 mg L^{-1} de gentamicina), 3) 2,5 mg L^{-1} e 4) 5,0 mg L^{-1} do OE *L. sidoides*, 5) 5,0 mg L^{-1} e 6) 10,0 mg L^{-1} do OE *O. gratissimum*, 7) 5,0 mg L^{-1} e 8) 10,0 mg L^{-1} do OE *Z. officinale*, cada um com três repetições, sendo a sobrevivência dos peixes registrada durante 10 dias. A maior taxa de sobrevivência de tambaquis foi alcançada pelo grupo tratado com 5,0 mg L^{-1} de OE *O. gratissimum* (89,5%), valores próximos aos obtidos no grupo controle negativo. Já com 5,0 mg L^{-1} do OE de *L. sidoides* a sobrevivência foi 75,0%, e para os demais tratamentos com OE os valores de sobrevivência foram próximos ou abaixo do registrado para o grupo controle positivo (70,8%). Na avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos foi observada redução nos valores de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos em tambaquis expostos aos OE *L. sidoides* e *Z. officinale* em relação aos grupos controle, entretanto não houve alteração significativa nos valores de glicose plasmáticas, proteínas totais e das enzimas aminotransferases (aspartato e alanina aminotransferase) entre os tratamentos avaliados. Na análise histopatológica do tecido hepático de tambaquis infectados com *A. hydrophila*,

após banhos com OE, foi observada a ocorrência de danos que variaram de leves a moderados. Os OE de *O. gratissimum* e *L. sidoides*, aplicados via banhos, promoveram melhor sobrevivência de tambaquis infectados com *A. hydrophila*, entretanto estratégias adicionais são necessárias para o uso destes óleos essenciais como antibacteriano. No capítulo 3 foi avaliado o efeito da inclusão de OEs de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* na dieta de juvenis de tambaqui sobre os parâmetros de crescimento, hematológicos e imunológicos, bem como sua resistência frente a infecção induzida por *A. hydrophila*. Sete dietas foram elaboradas (32% de proteína bruta) contendo duas concentrações de cada óleo essencial avaliado, compondo os tratamentos: 1) 0 g kg⁻¹ (controle); 2) 0,625 g kg⁻¹ e 3) 1,25 g kg⁻¹ de OE de *L. sidoides*; 4) 1,25 g kg⁻¹ e 5) 5,0 g kg⁻¹ de OE de *O. gratissimum*; 6) 1,25 g kg⁻¹ e 7) 5,0 g kg⁻¹ de OE de *Z. officinale*, com três repetições. Ao final de 30 e 60 dias de alimentação, os parâmetros de desempenho e algumas variáveis hematológicas não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$), sendo observado somente redução de trombócitos totais ao final de 30 dias de alimentação com 1,25 g kg⁻¹ e 5,0 g kg⁻¹ de OE de *O. gratissimum*. Após o período de 60 dias, os juvenis de tambaqui foram desafiados com a bactéria *A. hydrophila* ($1,6 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), sendo observados por 10 dias. A adição de 0,625 e 1,25 g kg⁻¹ do OE de *L. sidoides* na dieta de tambaquis promoveu respostas de imunidade inespecífica através do aumento da atividade respiratória de leucócitos, após infecção induzida, com redução nos níveis de glicose plasmática, que sugere ação da insulina, e sem alteração nos níveis de proteínas totais. A sobrevivência de peixes infectados com *A. hydrophila* foi maior naqueles alimentados com 0,625 g kg⁻¹ de OE de *L. sidoides*.

Palavras-chaves: antimicrobianos; óleos essenciais; ensaios *in vitro*; banhos terapêuticos; suplementação na dieta

Abstract

The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* essential oils (EOs) *in vitro* and *in vivo* by therapeutic baths and the supplementation in the diet of tambaquis juveniles (*Colossoma macropomum*) and their effects on growth, hematological, biochemical and histological parameters after challenge with *Aeromonas hydrophila*. In chapter 1, *in vitro* tests were carried out against 10 strains of *A. hydrophila* isolated from tambaquis, in addition to determining their chemical composition. The main compounds present in EOs were thymol (76.6%), *p*-cymene (6.3%) and β -caryophyllene (5.0%) for *L. sidoides*, eugenol (43.3%), 1,8-cineole (28.2%) and β -selinene (5.5%) for *O. gratissimum* and geraniol (23.2%), neral (16.7%) and 1,8-cineole (15.8%) to *Z. officinale*. All EOs evaluated showed bactericidal action against 10 strains of *A. hydrophila*, with minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bacterial concentration (MBC) ranging from 625 to 5,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Among the evaluated EOs, *L. sidoides* showed the best antimicrobial activity against *A. hydrophila* strains (MIC and MBC varying from 625 to 1,250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). In chapter 2, tambaqui juveniles were experimentally infected with *A. hydrophila*, and then subjected to 60-minute therapeutic baths for 5 consecutive days. The treatments applied were: 1) positive control (infected with *A. hydrophila* and no OE added), 2) negative control (infected with *A. hydrophila* and added 10 mg L^{-1} gentamicin), 3) 2.5 mg L^{-1} and 4) 5.0 mg L^{-1} of *L. sidoides* EO, 5) 5.0 mg L^{-1} and 6) 10.0 mg L^{-1} of *O. gratissimum* EO, 7) 5.0 mg L^{-1} and 8) 10.0 mg L^{-1} of *Z. officinale* EO, each with three repetitions, with fish survival recorded for 10 days. The highest survival rate of tambaqui was achieved by the group treated with 5.0 mg L^{-1} *O. gratissimum* (89.5%), values close to those obtained in the negative control group. Already with 5.0 mg L^{-1} of the *L. sidoides* EO the survival was 75.0%, and for the other treatments with EO the survival values were close to or below those registered for the positive control group (70.8%). In the evaluation of hematological and biochemical parameters it was observed reduction in hematocrit, hemoglobin and erythrocyte number in tambaqui exposed to *L. sidoides* and *Z. officinale* EO in control groups, however there was no significant change in plasma glucose, total protein values and the enzymes aminotransferases (aspartate and alanine aminotransferase) among the evaluated treatments. Histopathological analysis of liver tissue of tambaqui infected with *A. hydrophila* after baths with Eos showed mild to moderate damage. *O. gratissimum* and *L. sidoides* EOs, applied via baths, promoted better

survival of tambaquis infected with *A. hydrophila*, however additional strategies are needed for the use of these essential oils as antibacterial. In chapter 3, the effect of the inclusion of *L. sidoides*, *O. gratissimum* and *Z. officinale* Eos in the diet of tambaquis juveniles on the growth, hematological and immunological parameters, as well as their resistance to infection induced by *A. hydrophila* was evaluated. Seven diets were prepared (32% crude protein) containing two concentrations of each essential oil evaluated, comprising the treatments: 1) 0 g kg⁻¹ (control); 2) 0.625 g kg⁻¹ and 3) 1.25 g kg⁻¹ of *L. sidoides* EO; 4) 1.25 g kg⁻¹ and 5) 5.0 g kg⁻¹ of *O. gratissimum* EO; 6) 1.25 g kg⁻¹ and 7) 5.0 g kg⁻¹ of *Z. officinale* EO, with three repetitions. At the end of 30 and 60 days of feeding, the performance parameters and some hematological variables did not show significant differences between treatments ($p < 0.05$), being observed only reduction of total thrombocytes at the end of 30 days of feeding with 1.25 g kg⁻¹ and 5.0 g kg⁻¹ of *O. gratissimum* EO. After 60 days, tambaqui juveniles were challenged with the bacteria *A. hydrophila* (1.6×10^8 CFU mL⁻¹) and observed for 10 days. The addition of 0.625 and 1.25 g kg⁻¹ of *L. sidoides* EO in tambaqui diet promoted nonspecific immunity responses through increased leukocyte respiratory activity after induced infection, with a reduction in plasma glucose levels, which suggests insulin action, and no change in total protein levels. The survival of *A. hydrophila*-infected fish was higher in those fed with 0.625 g kg⁻¹ of *L. sidoides* EO.

Keywords: antimicrobials; essential oils; *in vitro* assays; therapeutic baths; dietary supplementation

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figure 1.** GC chromatogram of essential oil from *Lippia sidoides*. 64
- Figure 2.** GC chromatogram of essential oil from *Ocimum gratissimum*..... 64
- Figure 3.** GC chromatogram of essential oil from *Zingiber officinale*. 65

CAPÍTULO II

Figura 1. Taxa de sobrevivência de tambaquis (*C. macropomum*) infectado com *A. hydrophila* e submetidos a banhos terapêuticos com óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos determinados por ANOVA one-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). CP= Controle Positivo (peixe inoculado com *A. hydrophila* e não tratado com óleo essencial); CN= Controle Negativo (peixe inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 10 mg L⁻¹ de gentamicina); LS= *Lippia sidoides*; OG= *Ocimum gratissimum*; ZO= *Zingiber officinale*. 90

Figura 2. Alterações hepáticas leves e moderadas registradas em *C. macropomum* infectados com *A. hydrophila*, após banhos com óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*. a. hepatócito com núcleo picnótico (seta); b. infiltração leucocitária (estrela); c. hipertrofia celular (seta) e dilatação do capilar sinusóide (asteriscus); d. hepatócitos com núcleos picnóticos em posição marginal. 91

CAPÍTULO III

Figura 1. Taxa de sobrevivência (%) de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* por 60 dias e desafiados com a bactéria *A. hydrophila*. LS= *Lippia sidoides*; OG= *Ocimum gratissimum*; ZO= *Zingiber officinale* 123

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. Chemical composition (%) of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* essential oils..... 65

Table 2. Antibacterial activity of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* essential oils on *Aeromonas hydrophila* strains. 67

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição química (%) dos óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*. 92

Tabela 2. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaquis infectados com *A. hydrophila* e submetidos a banhos terapêuticos com de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*. 94

Tabela 3. Frequência de ocorrência (%) de danos em fígado de *C. macropomum* infectado por *A. hydrophila*, após banhos terapêuticos com óleo essencial de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*. 95

Tabela 4. Valores médios \pm erro padrão do Índice de alteração histopatológica (IAH) em fígado de *Colossoma macropomum* infectado por *Aeromonas hydrophila*, após banhos terapêuticos com óleo essencial de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale*. 96

CAPÍTULO III

Tabela 1. Composição química (%) dos óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*. 124

Tabela 2. Desempenho de crescimento (média \pm desvio padrão) de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*..... 126

Tabela 3. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*, ao final de 30 e 60 dias de alimentação e após o desafio com *A. hydrophila*. 127

Tabela 4. Contagem diferencial de leucócitos de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*, ao final de 30 e 60 dias de alimentação e após o desafio com *A. hydrophila*. 129

Tabela 5. Atividade respiratória de leucócitos de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*, ao final de 30 e 60 dias de alimentação e após o desafio com *A. hydrophila*. 130

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
Status atual da Aquicultura	19
O tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>	20
Bacterioses na Aquicultura: <i>Aeromonas hydrophila</i>	21
Antibióticos na Aquicultura	22
A utilização de plantas medicinais na Aquicultura	23
<i>Lippia sidoides</i>	24
<i>Ocimum gratissimum</i>	25
<i>Zingiber officinale</i>	27
Hematologia e histologia como ferramenta na aquicultura	28
3. Referências	31
OBJETIVOS	48
Objetivo geral:	48
Objetivos específicos:	48
FORMATAÇÃO DA TESE EM CAPÍTULOS	49
CAPÍTULO I	50
Antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against strains of <i>Aeromonas hydrophila</i>	50
Abstract	51
Introduction	52
Material and methods	52
<i>Plant material and essential oil extraction</i>	52
<i>Essential oils composition</i>	53
<i>Antimicrobial activity</i>	53
<i>Isolation of fish pathogens</i>	53
<i>Microorganisms and culture conditions</i>	54
<i>Test of antimicrobial activity</i>	54
<i>Statistical analysis</i>	55
Results and discussion	55
<i>Essential oils chemical composition</i>	55
<i>Antimicrobial assays</i>	56
Conclusion	58
Conflict of interest	58

Acknowledgements	58
References	58
CAPÍTULO II	68
Efeito dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i>, <i>Ocimum gratissimum</i> e <i>Zingiber officinale</i> sobre o tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) infectados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	68
Resumo	68
Abstract	70
Introdução	71
Material e Métodos	72
Extração e caracterização química dos óleos essenciais	72
Aclimação dos peixes	72
Inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i>	73
Desenho experimental	73
Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos	73
Análise histopatológica	74
Análise estatística	74
Resultados e discussão	75
Conclusão	80
Agradecimentos	80
Referências	81
CAPÍTULO III	97
Óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i>, <i>Ocimum gratissimum</i> e <i>Zingiber officinale</i> incorporados à dieta de <i>Colossoma macropomum</i>: crescimento, parâmetros hemato-imunológicos e resistência frente <i>Aeromonas hydrophila</i>	97
Resumo	97
Abstract	99
1. Introdução	100
2. Material e métodos	101
2.1. <i>Coleta dos peixes</i>	101
2.2. <i>Obtenção dos óleos essenciais</i>	102
2.3. <i>Preparo das rações</i>	102
2.4. <i>Desenho experimental</i>	103
2.5. <i>Desempenho de crescimento</i>	103
2.6. <i>Desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i></i>	103
2.7. <i>Colheita e análises sanguíneas</i>	104

2.8. <i>Análise da atividade respiratória de leucócitos</i>	105
2.9. <i>Análise estatística</i>	105
3. Resultados	105
3.1. <i>Composição dos óleos essenciais</i>	105
3.2. <i>Desempenho de crescimento</i>	105
3.3. <i>Parâmetros hematológicos e bioquímicos</i>	106
3.4. <i>Atividade respiratória de leucócitos</i>	106
3.5. <i>Sobrevivência de tabaquis após desafio com <i>A. hydrophila</i></i>	106
4. Discussão	107
4.1. <i>Composição dos óleos essenciais</i>	107
4.2. <i>Desempenho de crescimento</i>	108
4.3. <i>Parâmetros hematológicos</i>	109
4.4. <i>Atividade respiratória de leucócitos</i>	111
4.5. <i>Sobrevivência de tabaquis após desafio com <i>A. hydrophila</i></i>	112
5. Conclusão	112
Agradecimentos	113
Referências	113
Fíguas e Tabelas	123
Considerações finais	131

1. INTRODUÇÃO GERAL

O expressivo crescimento da população mundial e a evolução do mercado global fizeram com que a demanda por alimentos de origem animal aumentasse nas últimas décadas (Saath e Fachinello et al., 2018). De acordo com a Organização das Nações Unidas, estima-se que no ano de 2024 a população mundial seja de oito bilhões de pessoas, representando um aumento de 13,16% (ONU, 2012). Como forma de suprir esse crescimento, a aquicultura se tornou fonte de alimento e hoje é o setor que mais se desenvolve e cresce no mundo, sendo indicada como a próxima fronteira mundial na produção de alimentos (Schulter e Vieira Filho, 2017). Isso porque além de fonte de alimento, é uma alternativa de renda, consistindo em uma forma de subsistência para milhões de pessoas ao redor do mundo (FAO, 2016). Em 2016, a produção de aquicultura no mundo foi de 80 milhões de toneladas, com valor estimado em mais de 232 bilhões de dólares. Deste total, 54,1 milhões de toneladas foram para peixes, gerando uma cifra de 138,5 bilhões de dólares (FAO, 2018).

Como forma de consolidar esta crescente produção, o setor aquícola encontra-se cada vez mais empenhado em otimizar sua produtividade, reduzindo o tempo de produção e principalmente os custos, o que pode desencadear problemas que comprometam direta ou indiretamente o estado de saúde do organismo produzido (Valladão et al., 2015). Alguns fatores como altas densidades de estocagem, falta de manejo sanitário adequado, má qualidade da água, ração que não atenda as exigências nutricionais para cada espécie e estresse após despesca/transporte, podem facilitar o acesso e a invasão de agentes patogênicos, acarretando prejuízos econômicos incalculáveis (Martins, 2004; Tavares-Dias et al., 2006; Baldisseroto, 2009; Valladão et al., 2015; Leira et al., 2017).

Atualmente, surtos ocasionados por doenças infecciosas originadas por patógenos oportunistas são responsáveis por quase 50% nas perdas de produção, causando um dos principais riscos à sustentabilidade e lucratividade da produção aquícola, que estimam mundialmente perdas anuais de receita em torno de 6 bilhões de dólares (Assefa e Abunna, 2018). Entre as principais doenças que acometem os peixes de cultivo, destacam-se as causadas por bactérias do gênero *Aeromonas*, que pertencem à família Aeromonadaceae (Silva et al., 2010; Kim et al., 2018). Dentre as espécies do gênero de maior importância sanitária e que causam os maiores prejuízos em sistemas de criação na aquicultura, podemos destacar a infecção pela bactéria *Aeromonas hydrophila* (Nielsen et al., 2001; Evangelista-Barreto et al., 2010; Chen et al., 2010; Silva et al., 2010; Silva et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Aeromonas hydrophila se encontra amplamente distribuída no meio ambiente e é responsável pelos altos surtos de infecção registrados na aquicultura (Barcellos et al., 2008; Tavechio et al., 2009; Peixoto et al., 2012; Yang et al., 2016). Os sinais clínicos ocasionados por esse patógeno consistem em hemorragia no corpo e nas nadadeiras do peixe, evoluindo para ulcerações com perda de epitélio, o que retarda seu crescimento e ganho de peso (Boijink e Brandão, 2001; Leira et al., 2016). Como formas de tratamento e prevenção, são utilizados antibióticos e produtos químicos (Tavares-Dias et al., 2002; Schalch e Moraes, 2005; Chagas et al., 2006; Fujimoto et al., 2006; Figueiredo e Leal, 2008; Silva et al., 2009; Andrade-Porto et al., 2017), que em decorrência de seu uso indiscriminado comprometem o bem-estar dos hospedeiros, causam a contaminação do meio ambiente, promovem resistência antimicrobiana a múltiplas drogas, e conseqüentemente afetam a segurança do consumidor (Hirsch et al., 2006; Carneiro et al., 2007; Amarante et al., 2018; Cunha et al., 2018; Bandeira Júnior et al., 2019).

Diante desse quadro, a busca por novos agentes antimicrobianos e tratamentos alternativos, eficazes e de baixo custo, faz-se necessária. Produtos de origem vegetal apresentam propriedades antimicrobianas e imunoestimulantes devido à maior diversidade molecular presente em seus compostos comparado às derivadas de produtos sintéticos, sendo assim, seu uso como agente terapêutico e profilático no controle de vários agentes patogênicos tem sido recomendado na piscicultura (Sutili et al., 2015; Valladão et al., 2015). Principalmente quando se trata do uso de óleos essenciais, que são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis que podem constituir de 20 a 100 metabólitos secundários originários de uma única fonte botânica, despertando interesse em seus constituintes, em especial por sua atividade antimicrobiana (Moghaddam e Mehdizadeh, 2017). Entretanto, mais estudos são necessários a fim de explorar os recursos vegetais com potencial terapêutico, tais como determinação de dosagem adequada para cada hospedeiro/patógeno, testes de toxicidade ao hospedeiro, impacto ambiental e seguridade para o consumidor. Uma vez não cumpridas essas etapas, resultados indesejados e até mesmo a morte dos peixes podem ocorrer e gerar grandes perdas econômicas ao setor produtivo.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* *in vitro* e *in vivo* por meio de banhos terapêuticos e a suplementação na dieta de juvenis de *Colossoma macropomum*

sobre crescimento, parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos após desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Esta **Tese** é composta por uma Introdução Geral e por três capítulos:

O **Capítulo I** teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* frente 10 cepas de *Aeromonas hydrophila* isoladas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e determinar sua composição química.

O **Capítulo II** teve como objetivo avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* na sobrevivência, parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) infectado com *Aeromonas hydrophila*.

O **Capítulo III** teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão de óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* na dieta de tambaqui (*Colossoma macropomum*) sobre os parâmetros de crescimento, hematológicos e imunológicos, bem como sua resistência frente à infecção induzida por *Aeromonas hydrophila*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Status atual da Aquicultura

A aquicultura é uma atividade da agropecuária que mais cresce no mundo, produzindo importantes fontes de proteínas para consumo humano (FAO, 2016). Dentre as atividades desenvolvidas pela aquicultura, destaca-se a produção de peixes (Tavares-Dias e Mariano, 2015) com taxa anual de crescimento de 5,8% entre 2001 e 2016, superando o crescimento de outros grandes setores na produção de alimentos, como o de carne bovina em 2012 (ABPA, 2014; FAO, 2018). A aquicultura, além de fonte de alimento de alta qualidade, tem se tornado alternativa de renda (FAO, 2016). Estimativas mostram que 19,3 milhões de pessoas estejam envolvidas na aquicultura, contribuindo na subsistência de aproximadamente 32% de pessoas ao redor do mundo (FAO, 2018).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2018) o consumo de peixe no ano de 2015 atingiu 20,2 kg *per capita* a nível global, representando 17% de proteína animal consumida, com estimativas de chegar a 21,5 kg até o ano de 2030, o que impulsionaria positivamente o setor aquícola (FAO, 2018). Entretanto, em 2016, a produção mundial de pescado pela aquicultura foi de aproximadamente 54,1 milhões de toneladas, registrando uma pequena queda em

comparação aos dois anos anteriores (FAO, 2018). Fato que afetou cerca de 64% dos 25 principais países produtores de pescado, em especial a China, que é responsável pela maior produção e exportação de organismos aquáticos do mundo (FAO, 2018). Em seguida, aparecem como maiores produtores de organismos aquáticos a Índia, Indonésia, Vietnã, Bangladesh, Egito e Noruega (FAO, 2018).

O Brasil ocupa o 13º lugar na contribuição mundial de produção de pescado, com grande potencialidade de crescimento devido à disponibilidade de recursos hídricos, clima favorável e a diversidade natural de espécies de peixes (Brabo et al., 2016; FAO, 2018). Segundo o IBGE (2017), a produção total da aquicultura brasileira atingiu a marca de 485,2 mil toneladas, o que representou um decréscimo de aproximadamente 2,6% em relação ao registrado no ano anterior, mas ainda contribuindo com 70% de sua produção (3,07 bilhões de reais). Entre as espécies que contribuem com esse crescimento e demonstram grande potencialidade ao setor aquícola, mas que ainda necessitam de investimentos em pesquisas é o tambaqui (*Colossoma macropomum*).

O tambaqui *Colossoma macropomum*

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) é uma espécie nativa e oriunda das bacias dos rios Amazonas e Orinoco (Araújo-Lima e Goulding, 1998), considerada a segunda maior espécie de peixes com escamas da América do Sul (Goulding e Carvalho, 1982). É membro da família Serrasalminidae, que inclui 80 espécies e 15 gêneros (Ortí et al., 2008). Esta espécie é a segunda mais cultivada no Brasil (IBGE, 2017), e uma das mais importantes nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil (MPA, 2013). O estado de Rondônia é o maior produtor de tambaqui, produzindo 30,4 mil toneladas de pescado, representando 34,4% no percentual de participação em produção. O estado do Amazonas se encontra em sexto lugar, produzindo 5,6 mil toneladas ou 6,4% da participação de produção para o estado (IBGE, 2017).

A produção de tambaqui também é encontrada em outras regiões tropicais em países da América do Sul, como Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (Valladão et al., 2016). Esta atividade apresenta-se estabelecida no mercado devido o tambaqui apresentar alta rusticidade em ambientes de confinamento, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido, tolerância a baixos níveis de pH, fácil aceitação de dietas formuladas, rápido crescimento e adaptação em cativeiro, podendo alcançar 2,62 kg de peso após 10 meses de engorda em viveiros escavados com emprego de aeradores (Izel et al., 2013).

Em 2017, a produção mundial de tabaquis foi de aproximadamente 88,5 mil toneladas, representando 18,2% da produção nacional (FAO, 2018). Devido a grande expansão de seu cultivo, importância econômica e da ictiofauna amazônica, estudos voltados ao controle de doenças infecciosas no ambiente de cultivo se tornam necessários, tais como desenvolvimento de estratégias preventivas e alternativas de tratamento contra bacterioses, que possam viabilizar melhores condições para a criação de peixes.

Bacterioses na Aquicultura: *Aeromonas hydrophila*

No Brasil, doenças de origem bacteriana em peixes são relatadas com frequência e se manifestam principalmente em hospedeiros debilitados decorrente de práticas de manejo inadequadas, excesso de matéria orgânica na água, infecções primárias por parasitos e grau de virulência da bactéria (Sebastião et al., 2018). Algumas bactérias como as do gênero: *Flavobacterium* spp., *Yersinia* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Edwardsella* spp. e *Streptococcus* spp. são frequentemente relatadas causando patologias em peixes (Costa, 2004; Leira et al., 2016).

Dentre as bactérias de maior ocorrência na criação de peixes destacam-se as do gênero *Aeromonas*, que são responsáveis também por causar uma variedade de doenças em humanos (Guerra et al., 2007; Martineli et al., 2010; Tavares et al., 2014). Atualmente, o gênero *Aeromonas* possui 31 espécies reconhecidas (Tavares et al., 2014), sendo a espécie *A. hydrophila* a mais frequentemente associada a infecções em uma ampla variedade de espécies de peixes de água doce (Austin e Austin, 2007; Figueiredo e Leal, 2008; Valladão et al., 2015; Sebastião et al., 2018). Na indústria aquícola *Aeromonas hydrophila* têm causado grandes prejuízos econômicos devido à mortalidade de peixes (Oliveira et al. 2012; Hai, 2015; Abu-Elala et al., 2015; Yang et al., 2016).

Aeromonas hydrophila é um bastonete gram negativo com 0,3 – 1,0 µm de diâmetro por 1,0 – 3,5 µm de comprimento, móvel devido à presença de um flagelo polar, não produz esporos e não apresenta cápsula (Boijink e Brandão, 2001; Barcellos et al., 2008; Garcia e Moraes, 2009). São onipresentes em ambientes aquáticos (Griffin et al., 2013; Goharrizi et al., 2015), anaeróbica facultativa, mesofílica, com ampla distribuição geográfica, devido sua resistência a variações de temperaturas de 22 – 37°C (Tavares et al., 2014). Responsável pela septicemia hemorrágica, é caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais, nadadeiras corroídas, hemorragias locais, úlceras,

exoftalmia e ascite em peixes (Cipriano et al., 1984; Austin e Austin, 2007; Harikrishnan et al. 2010; Zhang et al., 2016; Kim et al., 2018), podendo culminar em surtos epizooticos.

Considerada um dos principais patógenos oportunistas que causam doenças em tambaqui, *A. hydrophila* está associada a frequentes registros de mortalidade na aquicultura (Figueiredo e Leal, 2008; Reque et al., 2010). O grau de patogênese da bactéria está relacionado à presença de endotoxinas (Claudiano et al., 2015; Ashraf e El-Malek, 2017) e também à diversidade de genes de virulência (Abdullah et al., 2003; Oliveira et al., 2012; Peixoto et al., 2012). Griffin et al. (2013) relatou uma nova cepa de *A. hydrophila* que resultou em perdas significativas em bagres criados em pisciculturas no Alabama e se espalhou para o Arkansas e Mississippi (EUA). Como forma de combater esse tipo de patogenos oportunistas o uso de antibióticos é uma prática bastante utilizada na aquicultura (FAO, 2005).

Antibióticos na Aquicultura

Antibióticos são substâncias naturais ou sintéticas com capacidade de inibir o crescimento ou causar a morte de um patógeno oportunista (Guimarães et al., 2010). Seu uso em animais tem sido relatado desde a década de 1940, logo após primeiros registros de bactérias resistentes (Lozano et al., 2018). Normalmente são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, onde atuam na biossíntese da parede celular, síntese de proteínas ou na replicação e reparo do DNA (Guimarães et al., 2010; Pereira e Oliveira 2016).

Na aquicultura, seu uso ocorre desde a década de 60 (Pilarski et al., 2017), entretanto, essa alternativa se torna cada vez mais insuficiente, onerosa e em alguns casos, motivo de fracasso devido a resistência desenvolvida em decorrência de seu uso indiscriminado (FAO, 2005). Na literatura há vários relatos de linhagens bacterianas resistentes a diversos antibióticos, resultando em consequentes perdas financeiras (Hirsch et al., 2006; Barcellos et al., 2008; Suhel et al., 2011; Peixoto et al., 2012; Gastalho et al., 2014; Choudhury et al., 2017).

Além disso, em decorrência de sua má administração ao longo dos anos, já foram relatados casos de imunossupressão, geração de substâncias tóxicas, poluição do meio ambiente e riscos à saúde humana (Reginato e Leal, 2010; Suhel et al., 2011; Arias e Carrilho, 2012; Shakya, 2015). Outra preocupação associada ao seu mau uso são os resíduos encontrados na carne (Choudhury et al., 2017). Segundo Gastalho et al. (2014)

esses impactos tendem a se tornar mais graves se a troca da água em que os peixes se encontram não for realizada adequadamente, o que pode potencializar a toxicidade de vários produtos químicos, o que conseqüentemente coloca a segurança alimentar do consumidor final em risco.

Ainda não é possível dimensionar a quantidade exata de antimicrobianos usados na aquicultura brasileira. Os fármacos utilizados em larga escala nas pisciculturas são oxitetraciclina e florfenicol, e têm seu uso regulamentado para o controle de doenças bacterianas na aquicultura (Teles, 2013). Por essa razão o MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) no ano de 2010 por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal (PNCRC/Animal), inseriu os dois medicamentos supracitados na lista dos antimicrobianos a serem fiscalizados em peixes de criação, em uma tentativa de restringir seu uso de forma desgovernada (Teles, 2013).

Nos últimos anos pesquisas estimulando a busca por produtos alternativos que controlem com eficácia as doenças bacterianas e parasitárias na piscicultura e que principalmente apresentem menor impacto ao hospedeiro e ao ambiente encontra-se em expansão (Reverter et al., 2014; Valladão et al., 2015). Os produtos naturais vêm ganhando grande importância no desenvolvimento de pesquisas e se mostram promissores agentes para a prevenção e controle de doenças, ganhando destaque e estabelecendo-se como uma alternativa promissora com possíveis fontes de substâncias com atividades antimicrobianas (Harikrishnan et al., 2011; Pandey et al., 2012). Diferente dos quimioterápicos, os produtos de origem vegetal apresentam vantagens, por serem de baixo custo, apresentarem facilidade de utilização/obtenção, são biodegradáveis e ainda podem apresentar baixo impacto ao meio ambiente.

A utilização de plantas medicinais na Aquicultura

O Brasil detém a maior porção da biodiversidade mundial (15 a 20%), com destaque para as plantas superiores, nas quais dispõe aproximadamente 24% da sua biodiversidade. Isso coloca o país em posição de vantagem em opções para o uso de plantas como recursos terapêuticos, fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos naturais (Brasil, 2006).

A busca por antimicrobianos naturais com baixa toxicidade, para mitigar o impacto ambiental ganhou grande proporção nos últimos anos. Dentre os antimicrobianos naturais, destacam-se os óleos essenciais (OE), os quais foram obtidos pela primeira vez

na Idade Média pelos árabes, e hoje são amplamente utilizados. Compreendem características dos OEs: forte aroma, ricos em compostos voláteis, naturais, complexos, normalmente obtidos por meio de vapor ou hidrodestilação (Bakkali et al., 2008).

Estima-se que mais de 3.000 tipos de OEs sejam conhecidos, dos quais 300 tenham elevada importância comercial, principalmente para as indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica, agrônômica, sanitária e de perfumaria (Lagha et al., 2019). Os OEs são lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos com densidade usualmente menor que a da água. Podem ser extraídos de botões, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca (Bakkali et al., 2008), mas suas folhas ganham grande destaque. Dentre os principais constituintes presentes nos OEs estão as classes de monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos, compostos geralmente sensíveis ao oxigênio, luz, calor e umidade (Moghaddam e Mehdizadeh, 2017).

Os OEs exercem grande importância na aquicultura como antibacteriano (Nya e Austin, 2009; Veras et al., 2014; Sutili et al., 2015; Snuossi et al., 2016; Majolo et al., 2018), antiparasitário (Hashimoto et al., 2016; Soares et al., 2017; Meneses et al., 2018; Ribeiro et al., 2018), anestésico (Boijink et al., 2016; Batista et al., 2018; Spanghero et al., 2019), imunomodulador (Brum et al., 2017; Rodrigues-Soares et al., 2018). Representando uma alternativa para sua aplicação na aquicultura. Bons resultados têm sido observados em vários países do mundo como México, Índia, Tailândia, Japão, Reino Unido, Nigéria e Brasil (Auro de Ocampo e Jimenez, 1993; Dey e Chandra, 1995; Direkbusarakom et al., 1996; Logambal et al., 2000; Nya e Austin, 2009).

O Ministério da Saúde (MS) possui uma lista com 71 espécies inseridas na Relação Nacional de Plantas Medicinais Nacionais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS), que possuem potencial terapêutico, para orientar a cadeia produtiva e o desenvolvimento de pesquisas. O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi instituído em dezembro de 2008 pela portaria nº 2.960. Dentre as 71 espécies destacam-se *Ocimum gratissimum*, *Lippia sidoides* e *Zingiber officinale*, que foram escolhidas para o desenvolvimento deste estudo.

Lippia sidoides

O gênero *Lippia* consiste em aproximadamente 200 espécies de ervas, entre elas *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae), popularmente conhecida como alecrim-pimenta, é um arbusto aromático nativo do nordeste brasileiro, que tem mostrado valiosas propriedades biológicas e potencial fonte de compostos biologicamente ativos (Lorenzi e

Matos, 2008). Os produtos derivados de *L. sidoides* tem uso comprovado na medicina popular (Almeida et al., 2010), com grande importância na farmacologia por suas características calmante, anti-inflamatória, tratamento de doenças respiratórias, analgésica, sedativa, anti-viral, ansiolítica e expectorante (Mattos et al., 2007). Seu OE possui elevado valor comercial e ampla diversidade química (Santos et al., 2015), tendo como composto majoritário o timol, o qual apresenta propriedades antimicrobianas (Oliveira et al., 2006; Castro et al., 2011; Guimarães et al., 2014; Veras et al., 2014; Majolo et al., 2017; Majolo et al., 2018), inseticida (Costa et al., 2005; Carvalho et al., 2013), antioxidante (Almeida et al., 2010), antihelmíntica (Camurça-Vasconcelos et al., 2007; Souza et al., 2010), acaricida (Cavalcanti et al., 2010; Gomes et al., 2012) e fungicida (Fontenelle et al., 2007; Brito et al., 2015, Baldim et al., 2019).

Majolo et al. (2018) avaliaram o potencial antimicrobiano *in vitro* do OE de *L. sidoides* contra a bactéria *Streptococcus agalactiae*, constatando sua atividade antimicrobiana com concentração inibitória mínima (CIM) de 312,5 µg mL⁻¹ e concentração bactericida mínima (CBM) de 416,7 µg mL⁻¹. Também em estudos de Majolo et al. (2017) três espécies de *Lippia* mostraram atividade antimicrobiana frente a bactéria *A. hydrophila*, com ação bacteriostática e bactericida variando de 1.250 a 5.000 µg mL⁻¹, evidenciando melhor desempenho com o óleo essencial de *L. sidoides*.

Ainda são escassos os estudos que confirmem o potencial terapêutico de OEs *in vivo*, já que a maioria dos estudos usando o potencial antimicrobiano de produtos vegetais limita-se somente na realização testes *in vitro*. Poucos são os estudos que avaliam a eficácia *in vivo*, estudos como de Soares et al. (2017) avaliando a atividade antiparasitária *in vivo* e *in vitro* do OE de *L. sidoides* relataram que as concentrações 320 e 160 mg L⁻¹ foram 100% eficazes contra monogenoídeos em 10 e 60 min de exposição, respectivamente. Nos testes *in vivo*, os juvenis foram submetidos a 60 min de banho com 10 mg L⁻¹ e 15 min de banho com 20 mg L⁻¹ do OE de *L. sidoides*, estes banhos terapêuticos não foram eficientes contra *Ichthyophthirius multifiliis* e monogenoídeos presentes nas brânquias de *C. macropomum*. Hashimoto et al. (2016) avaliaram através de banhos terapêuticos peixes tratados com OEs de *L. sidoides* na concentração 20 mg L⁻¹ em tilápia do Nilo parasitados por monogenoídeos, mostrando eficácia de 14,16%. A atividade antimicrobiana *in vivo* do OE de *L. sidoides* frente à bactéria *A. hydrophila* em tambaqui ainda não foi relatada.

Ocimum gratissimum

Ocimum gratissimum, popularmente conhecida como alfavaca, alfavacão, alfavaca-cravo e manjerição, é um subarbusto aromático pertencente a família Lamiaceae, originária da Ásia (Martins et al., 2004; Lorenzi e Matos, 2008). É encontrada em regiões tropicais e quentes, como a África, Ásia, Índia, Europa, América Central, América do Sul e distribuída em todo o Brasil (Padalia et al., 2014; Brasil, 2015). Em um levantamento realizado pelo Ministério da Saúde (2015) foi registrado o uso de partes aéreas, inflorescências, folhas e raízes com finalidade terapêutica, entretanto 70% da bibliografia analisada faz uso das folhas. Suas folhas são ricas em óleos essenciais destinados à produção de perfumes, cosméticos e fármacos (Morales e Simon, 1996). O OE presente nas suas folhas exercem atividade antimicrobiana (Franco et al., 2007; Alo et al., 2012; Aguiar et al., 2015; Bandeira Junior et al., 2019), acaricida (Lima et al., 2018), inseticida (Gomes e Favero, 2011; Benelli et al., 2019), anestésica (Benovit et al., 2012; Boijink et al., 2016), antihelmíntica (Meneses et al., 2018) e antioxidante (Pereira e Maia, 2007; Akinrinde et al., 2016; Houndou et al., 2016; Abdel-Tawwab et al., 2018), tanto nas formas de extrato como OE (Aguiyi et al., 2000).

Bandeira Junior et al. (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* e a atividade antiparasitária *in vivo*, através de banhos terapêuticos, com o OE de *O. gratissimum* em *Rhamdia quelen*. Os valores CIM e CBM variaram de 400 a 1600 µg mL⁻¹ para espécies de *Aeromonas*. Também mostraram atividade antiparasitária significativa contra o monogenoídeo *Gyrodactylus sp.* após uma hora de exposição nas concentrações 5 e 10 mg L⁻¹, com eficácia parasitária de 35 e 50%, respectivamente. Boijink et al. (2016), em banhos com OE de *O. gratissimum* nas concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹, encontraram 100% de eficácia do OE contra parasitos monogenoídeos de tambaquis.

Com OE de *O. gratissimum* foi relatada atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* frente ao monogenoídeo *Cichlidogyrus tilapiae*, com 80% de sobrevivência dos parasitos nas concentrações de 160 e 320 mg L⁻¹ nos testes *in vitro* e no ensaio *in vivo* a concentração recomendada foi de 160 mg L⁻¹ em banhos de curta duração (10 min) por três dias consecutivos para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Meneses et al., 2018). Já Majolo et al. (2018) testaram o OE de *O. gratissimum* *in vitro* contra *S. agalactiae*, sendo estabelecida a CIM e CBM em 2.500 µg mL⁻¹.

Em tilápia do Nilo, a suplementação das dietas com 0,5% kg⁻¹ ração de OE de *O. gratissimum* proporcionou melhor crescimento e ganho de peso ao final de 55 dias de alimentação, ao final deste período foram os peixes desafiados com a bactéria *S.*

agalactiae e avaliados por 10 dias, apresentando melhoras na resposta imune e resistência a doenças, evidenciando seu potencial para melhor desempenho de crescimento e resposta imune de peixes frente *S. agalactiae*, (Brum et al., 2017). Entretanto, estudo avaliando a atividade antimicrobiana deste OE nas vias de administração banhos e suplementação na dieta para juvenis de tambaqui ainda não foram realizados.

Zingiber officinale

O gengibre (*Zingiber officinale*), pertence à família Zingiberaceae que compreende mais de 1.200 espécies de plantas inseridas em 53 gêneros, sendo que o gênero *Zingiber* inclui 85 espécies (Barros Gomes et al., 2016). *Zingiber officinale* é uma planta herbácea perene, cujos rizomas são amplamente comercializados em função de seu emprego alimentar e industrial (Lorenzi e Matos, 2008). Apresentam corpo alongado, odor e sabor característicos, aromáticos e pungentes (Shakya, 2015). Dentre as propriedades do gengibre comprovadas cientificamente, citam-se as atividades antioxidantes (Beal, 2006; Andreo e Jorge, 2011), anti-inflamatórias (Camargo, 2006), antibacterianas (Grégio et al., 2006; Gull et al., 2012; Andrade et al., 2012; Majolo et al., 2014; El-Sherbiny, 2015), larvicida e repelente (Khandagle et al., 2011), entre outras (Kumar et al., 2011).

Estudos recentes mostraram efeitos benéficos com o uso do OE de *Z. officinale*. Snuossi et al. (2016) avaliaram a atividade antioxidante e antibacteriana do OE de *Z. officinale* contra alguns isolados bacterianos de robalo (*Dicentrarchus labrax*) e dourada (*Sparus aurata*), cuja identificação dessas linhagens foram *A. hydrophila*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Serratia odorífera* e *Staphylococcus lugdunensis*. A espécie *A. hydrophila* teve maior dominância entre os achados, apresentando valores de CIM variando de 0,05 a 0,20 mg mL⁻¹ e CBM variando de 12,5 a 50,0 mg mL⁻¹, desempenhando positiva atividade antibacteriana. Já Fu et al. (2019) avaliaram a eficácia e o mecanismo antiparasitário de compostos ativos isolados de *Z. officinale* contra *Ichthyophthirius multifiliis*. O composto 10-gingerol apresentou 100% de eficácia antiparasitária *in vitro* nas concentrações de 2, 8 e 16 mg L⁻¹, já nos ensaios *in vivo* a concentração 4 mg L⁻¹ reduziu significativamente a infestação por *I. multifiliis* em carpas (*Cyprinus carpio*).

Outros estudos mostram que a incorporação de *Z. officinale* na dieta de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foi eficaz na redução da mortalidade dos peixes e controle das infecções ocasionadas por *A. hydrophila* (Nya e Austin, 2009). Ahmadifar

et al. (2019) avaliaram dietas contendo 0, 1, 2 e 3% de pó de gengibre na alimentação de peixe zebra (*Danio rerio*) por 60 dias e não evidenciaram melhoras em seus parâmetros de crescimento. Brum et al. (2017) não observaram incremento nos parâmetros de crescimento de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com suplementação de 1,0% e 1,5% de óleo essencial de gengibre, entretanto sua resposta imune contra *S. agalactiae* foi positiva. Dugenci et al. (2003) incorporaram 1% de extrato aquoso de raízes de gengibre em pó, por três semanas, à dieta de truta arco-íris, que exibiram resposta imune não específica significativa.

Com base nessas considerações, visando reduzir ou evitar a atual dependência de quimioterápicos e antimicrobianos na criação de peixes, a avaliação de produtos alternativos como extratos vegetais de plantas bioativas vem sendo priorizada. Entretanto, alterações comportamentais podem ser evidenciadas nas diferentes vias de administração, seja ela através de banhos terapêuticos ou suplementadas na ração. Diante disso, diferentes parâmetros são utilizados como indicadores do estado de saúde de peixes, dentre eles, a avaliação do perfil hematológico, bioquímico e histológico.

Hematologia e histologia como ferramenta na aquicultura

Os teleósteos desempenham habilidade de percepção quando são expostos a situações que possam causar algum tipo de dano, isso se deve ao sistema nociceptivo que são capazes de captar e conduzir estímulos (Pádua et al., 2013). Os parâmetros hematológicos e bioquímicos são ferramentas que identificam modificações nos padrões e alterações morfológicas das células do sangue (Tavares-Dias e Moraes, 2007; Silva et al., 2012). Suas análises fornecem grande contribuição no diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas em populações de peixes (Tavares-Dias e Moraes, 2004), na qual é bem aceita e vista como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos (Ranzani-Paiva et al., 2013).

O sangue de teleósteos é constituído por eritrócitos, leucócitos e trombócitos (Tavares-Dias e Moraes, 2004). Os eritrócitos são as células de maior número presentes na circulação sanguínea e responsáveis pelo transporte de oxigênio e gás carbônico no sangue, função desempenhada pela hemoglobina (Ranzani-Paiva et al., 2013). Estas células apresentam os indicadores hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem de eritrócitos, responsáveis em avaliar a habilidade do transporte de oxigênio disponível no habitat de origem dos peixes (Tavares-Dias e Moraes, 2004). E para auxiliar na avaliação e classificação de anemias em geral, são utilizados os índices hematimétricos:

o volume corpuscular médio permite avaliar o volume dos eritrócitos, hemoglobina corpuscular média determina a quantidade de hemoglobina presente em cada eritrócito e a concentração de hemoglobina corpuscular média relaciona a concentração do pigmento hemático nos eritrócitos. Esses índices são as relações entre hematócrito e número de eritrócitos, taxa de hemoglobina e número de eritrócitos, e taxa de hemoglobina e hematócrito (Ranzani-Paiva et al., 2013).

Os leucócitos e trombócitos compreendem a identificação, quantificação e avaliação morfológica circulante (Tavares-Dias e Moraes, 2004). Os leucócitos são células de defesa do sistema immune consideradas de maior importância (Tavares-Dias et al., 2008) por atuarem na avaliação do sistema imunológico e inflamatório dos peixes. Os leucócitos observados na circulação de peixes são monócitos, linfócitos, neutrófilos, trombócitos e células granulocíticas especiais (CGE) (Ishikawa et al., 2008; Ranzani-Paiva et al., 2013). Os trombócitos são células que atuam no processo de coagulação sanguínea e também na defesa orgânica dos peixes, uma vez que são capazes de realizar atividade fagocitária (Tavares-Dias e Moraes 2004; Drumond et al., 2010). A quantificação das células de defesa no hospedeiro constitui ferramenta útil para avaliar as condições de estresse do peixe, associado a enfermidades (Santos e Tavares-Dias, 2010). Tais resultados podem elucidar importantes aspectos farmacológicos presentes nos óleos essenciais do presente estudo, permitindo utilização segura respeitando seus possíveis riscos aos peixes (Dutra, 2009).

Hashimoto et al. (2016) avaliaram o uso de banhos terapêuticos contendo os OE de *L. sidoides* e *Mentha piperita* sobre os parâmetros hematológicos em tilápia do Nilo parasitados pelos monogenoideos *Cichlidogyrus tilapiae*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus halli* e *Scutogyrus longicornis*, não evidenciando alterações hematológicas quando utilizado o OE de *M. piperita*, diferindo dos resultados com OE de *L. sidoides*, que apresentou redução no número total de glóbulos vermelhos (RBC) e trombócitos. A concentração de glicose e contagem de neutrófilos foram significativamente maiores nos peixes tratados com *L. sidoides*. Outros estudos como o de Soares et al. (2017) constataram aumento nos níveis de proteína total de tambaquis após serem submetidos a banhos com o OE de *Lippia origanoides*, já os valores de número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina nos peixes expostos a 20 mg L⁻¹ foram abaixo do recomendado para a espécie. Talpur et al. (2014) em dieta suplementada com OE de *M. piperita* evidenciaram aumento significativo em eritrócitos, leucócitos, hematócrito, hemoglobina em *Lates calcarifer* tratados com *Mentha piperita*.

Outra importante ferramenta utilizada na avaliação do estado de saúde de peixes é a histologia, que auxilia na identificação de alterações nos tecidos e órgãos, sendo muito eficaz para detectar os diversos efeitos da exposição aguda ou crônica (Hinton et al., 1992). Esses efeitos normalmente são decorrentes das mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocasionam a formação dos diferentes tipos de lesões, que pode estar presente em qualquer tecido do hospedeiro (Hinton e Laurén, 1990; Souza et al., 2003).

A utilização de OEs na prevenção e/ou tratamento de doenças infecciosas em peixes pode ser uma estratégia promissora a fim de reduzir o uso de antibióticos convencionais na aquicultura (Cunha et al., 2018). No entanto, ainda são poucas as informações disponibilizadas que avaliem os possíveis efeitos de sua aplicação sobre os órgãos alvos em organismos aquáticos.

Soares et al. (2017) identificaram alterações severas e danos irreversíveis nas brânquias de tambaquis após os banhos com OE de *L. sidoides*, nas concentrações de 10 e 20 mg L⁻¹. As lesões mais recorrentes encontradas foram: hiperplasia e fusão do epitélio lamelar, vasodilatação, descolamento de epitélio branquial e aneurisma lamelar, colapso epitelial com hemorragia, congestão, edema e necrose, proliferação das células mucosas e células de cloreto e hipertrofia lamelar. Sönmez et al. (2015) observaram congestão, necrose ou degeneração em amostras de fígado e rim de truta (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com 1,5% do óleo de 1,8-cineole, carvacrol e pulegona durante por 60 dias. Já Brum et al. (2018) avaliando dois OEs, afirmaram que ao final de 55 dias de alimentação com dietas suplementadas com *O. gratissimum* a 1,5% kg⁻¹ dieta, as tilápias apresentaram menor grau de picnose nos hepatócitos, enquanto os tratados com *Z. officinale* a 1,0% e 1,5% mostraram redução na hiperplasia interlamelar. Após infecção com *S. agalactiae*, o grau de congestão hepática foi reduzido nos peixes alimentados com 1,5% de *O. gratissimum* kg⁻¹ dieta, e neste tratamento o grau de necrose hepática foi reduzido. Com base nestes estudos, óleos essenciais adicionados à dieta em doses moderadas não causaram danos aos órgãos e mostraram-se úteis para amenizar danos teciduais, inclusive em situações de infecção bacteriana.

Nesse sentido, a histologia é uma ferramenta que tem sido utilizada para avaliar danos nos tecidos dos animais após ensaios de toxicidade com OE (Malheiro et al., 2016), assim como em processo anti-inflamatório associado a parasitos de peixes (Veras et al., 2014; Baldissera et al., 2017), suplementação de OE na dieta seguido de desafio bacteriano (Nya e Austin, 2009; Brum et al., 2017) e banhos terapêuticos aplicados no controle de parasitos (Costa et al., 2017; Soares et al., 2016; Soares et al., 2017). Logo

características teciduais dos órgãos internos podem expressar possíveis efeitos tóxicos de substâncias às quais os animais são expostos (Schwaiger et al., 1997).

3. Referências

- Abdel-Tawwab, M., Adeshina, I., Jenyo-Oni, A., Ajani, E.K., Emikpe, B.O. (2018) Growth, physiological, antioxidants, and immune response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.), to dietary clove basil, *Ocimum gratissimum*, leaf extract and its susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Fish and Shellfish Immunology*. 78, 346-354.
- Abdullah, A.I., Hart, C.A., Winstanley, C. (2003) Molecular characterization and distribution of virulence associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. *Journal of Applied Microbiology*. 95, 1001-1007.
- ABPA - Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura. (2014) Associação Cultural e Educacional Brasil - ACEB, Florianópolis.
- Abu-Elala, N., Abdelsalam, M., Marouf, S., Setta, A. (2015) Comparative analysis of virulence genes, antibiotic resistance and gyrB-based phylogeny of motile *Aeromonas* species isolates from Nile tilapia and domestic fowl. *Letters in Applied Microbiology*. 61 (5), 429-436.
- Aguiar, J.J.S., Sousa, C.P.B., Araruna, M.K.A., Silva, M.K.N., Portelo, A.C., Lopes, J.C., Carvalho, V.R.A., Figueredo, F.G., Bitu, V.C.N., Coutinho, H.D.M., Miranda, T.A.S., Matias, E.F.F. (2015) Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. *European Journal Integrative Medicine*. 7, 151-156.
- Aguiyi, J.C., Obi, C.I., Gang, S.S., Igweh, A.C. (2000) Hypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. *Fitoterapia*. 71, 444-446.
- Ahmadifar, E., Sheikhzadeh, N., Roshanaei, K., Dargahi, N., Faggio, C. (2019) Can dietary ginger (*Zingiber officinale*) alter biochemical and immunological parameters and gene expression related to growth, immunity and antioxidant system in zebrafish (*Danio rerio*)?. *Aquaculture*. 507, 341-348.
- Akinrinde, A.S., Oyagbemi, A.A., Omobowale, T.O., Asenuga, E.R., Ajibade, T.O. (2016) Alterations in blood pressure, antioxidant status and caspase 8 expression in cobalto chloride-induced cardio-renal dysfunction are reversed by *Ocimum gratissimum* and gallic acid in Wistar rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 36, 27-37.

- Almeida, M.C.S., Alves, L.A., Souza, L.G.S., Machado, L.L., Matos, M.C., Oliveira, M.C.F., Lemos, T.L.G. (2010) Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. *Química Nova*. 33 (9), 1877-1881.
- Alo, M.N., Anyim, C., Igwe, J.C., Elom, M., Uchenna, D.S. (2012) Antibacterial activity of water, ethanol and methanol extracts of *Ocimum gratissimum*, *Vernonia amygdalina* and *Aframomum melegueta*. *Pelagia Research Library*. 3 (2), 844-848.
- Amarante, J.F., Kolling, L., Ferronato, A.I., Vargas, A.C., Costa, M.M., Amarante, T.A.B. (2018) Resistência aos antimicrobianos de bactérias obtidas de carpas (*Cyprinus carpio*) cultivadas em sistema semi-intensivo. *Ciência Animal Brasileira*. 19, 1-7.
- Andrade, M.A., Cardoso, M.G., Batista, L.R., Mallet, A.C.T., Machado, S.M.F. (2012) Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Ciannamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*. 43 (2), 399-408.
- Andrade-Porto, S.M., Affonso, E.G., Kochhann, D., Malta, J.C.O., Roque, R., Ono, E.A., Araújo, C.S.O., Tavares-Dias, M. (2017) Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). *Aquaculture*. 479, 38-44.
- Andreo, D., Jorge, N. (2011) Capacidade Antioxidante e Estabilidade Oxidativa de *Gengiber officinale*. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. 13 (1), 33-37.
- Araújo-Lima, C., Goulding, M. (1998) Os frutos do tambaqui: Ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefê: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília.
- Arias, M.V.B., Carrilho, C.M.D.M. (2012) Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação?. *Semina: Ciências Agrárias*. 33 (2), 775-790.
- Ashraf, M., El-Malek, A. (2017) Incidence and virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in fish. *Veterinary World*. 10, 34-37.
- Assefa, A., Abunna, F. (2018) Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. *Veterinary Medicine International*. 1-10.
- Auro de Ocampo, A., Jimenez, E.M. (1993) Herbal medicines in the treatment of fish diseases in Mexico. *Veterinaria México*. 24, 291-295.
- Austin, B., Austin, D.A. (2007) Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish. Springer-Praxis Publishing, Ltd., Chichester.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils - A review. *Food Chemistry Toxicology*. 46, 446–475.
- Baldim, I., Tonani, L., Kress, M.R.Z., Oliveira, W.P. (2019) *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti *Candida* agent. *Industrial Crops & Products*. 127, 73-81.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., B. Júnior, G., De Vargas, A. C., Boligon, A.A., De Campos, M.M.A., Stefani, L.M., Baldisserotto, B. (2017) *Melaleuca alternifolia* essential oil enhances the non-specific immune system and prevents oxidative damage in *Rhamdia quelen* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*: Effects on cholinergic and purinergic systems in liver tissue. *Fish & Shellfish Immunology*. 61, 1-8.
- Baldisserotto, B. (2009) *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. 2ª ed. Rio Grande do Sul, Santa Maria.
- Bandeira Junior, G., Souza, C.F., Baldissera, M.D., Descovi, S.N., Silveira, B.P., Tasca, C., Mourão, R.H.V., Vargas, A.P.C., Baldisserotto, B. (2019) Plant essential oils bacteria isolated from fish: an *in vitro* screening and *in vivo* efficacy of *Lippia origanoides*. *Ciência Rural*. 49 (6), 1-8.
- Bandeira Junior, G., Pês, T.S., Saccol, E.M.H., Sutili, F.J., Rossi-Jr, W., Murari, A.L., Heinzmann, B.M., Pavanato, M.A., Vargas, A.C., Silva, L.L., Baldisserotto, B. (2017) Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. *Industrial Crops and Products*. 97, 484-491.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Santos, L.R., Motta, A.C., Ritter, F., Bedin, A.C., Silva, L.B. (2008) *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: Aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. *Boletim Instituto de Pesca*. 34 (3), 355-363.
- Barros Gomes, P.R.B., Santana, A.L., Mouchrek, V.E., Mouchrek, A.N., Everton, P.C. (2016) Avaliação físico-química do óleo essencial *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre). *Revista Cubana de Farmacia*. 50 (2), 1-10.
- Batista, E.S., Brandão, F.R., Majolo, C., Inoue, L.A.K.A., Maciel, P.O., Oliveira, M.R., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C. (2018) *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. *Aquaculture*. 495, 545-549.
- Beal, B.H. (2006) Atividade antioxidante e identificação dos ácidosfenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). Dissertação de Mestrado, Universidade de Santa Catarina, 86.

- Benelli, G., Pavela, R., Maggi, F., Wandjou, J.G.N., Fofie, N.G.B.Y., Koné-Bamba, D., Sagratini, G., Vittori, S., Caprioli, G. (2019) Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from *Ocimum gratissimum* grown in Ivory Coast: Efficacy on insect pests and vectors and impact on non-target species. *Industrial Crops & Products*. 132, 377-385.
- Benovit, S.C., Gressler, L.T., Silva, L.L., Garcia, L.O., Okamoto, M.H., Pedron, J.S., Sampaio, L.A., Rodrigues, R.V., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B. (2012) Anesthesia and Transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with Essential Oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 43 (6), 896-900.
- Boijink, C.L., Brandão, D.A. (2001) Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciência Rural*. 31 (3), 503-507.
- Boijink, C.L., Queiroz, C.A., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Inoue, L.A.K.A. (2016) Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture*. 457, 24-28.
- Brabo, M.F., Pereira, L.F.S., Santana, J.V.M., Campelo, D.A.V., Veras, G.C. (2016) Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. *Acta Fish*. 4 (2), 50-58.
- Brasil. Ministério da Saúde e ANVISA. (2015) Monografia da espécie *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca).
- Brasil. Ministério da Saúde. (2006) Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.
- Brito, D.I.V., Morais-braga, M.F.B., Cunha, F.A.B., Albuquerque, R.S., Carneiro, J.N.P., Lima, M.S.F., Leite, N.F., Souza, C.E.S., Andrade, J.C., Alencar, L.B.B., Lavor, A.K.L.S., Figueredo, F.G., Lima, L.F., Coutinho, H.D.M. (2015) Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 17 (4), 836-844.
- Brum, A., Cardoso, L., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L. (2018) Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*. 490, 98-107.
- Brum, A., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Chagas, E.D., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L. (2017) Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile

- tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*. 468, 235-243.
- Camargo, L.M.S. (2006) Efeito antiinflamatório do extrato de *Zingiber officinale* aplicado por fonoforese sobre o edema de pata de ratos. Dissertação de Mestrado, Universidade do Vale da Paraíba, 76.
- Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Maciel, M.V., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B. (2007) Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*. 148, 288-294.
- Carneiro, D.O., Figueiredo, H.C.P., Pereira Júnior, D.J., Leal, C.A.G., Logato, P.V.R. (2007) Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59 (4), 869-876.
- Carvalho, R.R.C., Laranjeira, D., Carvalho-filho, J.L.S., Souza, P.E., Blank, A.F., Alves, P.B., Jesus, H.C.R., Warwick, D.R.N. (2013) *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. *Química Nova*. 36 (2), 241-244.
- Castro, C.E., Ribeiro, J.M., Diniz, T.T., Almeida, A.C., Ferreira, L.C., Martins, E.R., Duarte, E.R. (2011) Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 13 (3), 293-297.
- Cavalcanti, S.C.H., Niculau, E.S., Blank, A.F., Câmara, C.A.G., Araújo, I.N., Alves, P.B. (2010) Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Bioresource Technology*. 101, 829-832.
- Chagas, E.C., Gomes, L.C., Silva, A.L.F., Gomes, L.C., Brandão, F.R. (2006) Respostas fisiológicas de tambaqui a banhos terapêuticos com mebendazol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41 (4), 713-716.
- Chen, R., Zhou, Z., Cao, Y., Bai, Y., Yao, B. (2010) Research High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microbial Cell Factories*. 9 (39), 1-10.

- Choudhury, T.G., Nagaraju, V.T., Gita, S., Paria, A., Parhi, J. (2017) Advances in Bacteriophage Research for Bacterial Disease Control in Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 1-13.
- Cipriano, R.C., Bullock, G.L., Pyle, S.W. (1984) *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. US Fish & Wildlife Publications. 134, 1-23.
- Claudiano, G.S., Yunis-Aguinaga, J., Marinho-Neto, F.A., Miranda, R.L., Martins, I.M., Otani, F.S., Mundim, A.V., Marzocchi-Machado, C.M., Moraes, J.R.E., Moraes, F.R. (2015) Hematological and immune changes in *Piaractus mesopotamicus* in the sepsis induced by *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*. 88, 259-265.
- Costa, A.B. (2004) Estratégias para o estudo de bactérias potencialmente patogênicas na piscicultura. IN: Cyrino, J.E, Urbinati, E.C., Fracolossi, D.M., Castognoli, N. (Eds). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt.
- Costa, J.C., Valladão, G.M.R., Pala, G., Gallani, S.U., Kotzent, S., Crotti, A.E.M., Fracarolli, L., Silva, J.J.M., Pilarski, F. (2017) *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*. 471, 72–79.
- Costa, J.G.M., Rodrigues, F.F.G., Angélico, E.C., Silva, M.R., Mota, M.L., Santos, N.K.A., Cardoso, A.L.H., Lemos, T.L.G. (2005) Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 15 (4), 304-309.
- Cunha, J.A, Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B. (2018) The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens – a review. *Journal of Applied Microbiology*. 125, 328-344
- Dey, R.K., Chandra, S. (1995) Preliminary studies to raise disease resistant seed (fry) of Indian major carp *Catla catla* (Ham.) through herbal treatment of spawn. *Fish Chimes*. 14, 23-25.
- Direkbusarakom, S., Herunsalee, A., Yoshimizu, M., Ezura, Y. (1996) Antiviral activity of several Thai traditional herb extracts against pathogenic viruses. *Fish Pathology*. 31, 209-213.
- Drumond, G.V.F., Caixeiro, A.P.A., Tavares-Dias, M., Marcon, J.L., Affonso, E.G. (2010) Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas*

- Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. *Acta Amazônica*. 40 (3), 591-596.
- Dugenci, S.K., Arda, N., Candan, A. (2003) Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*. 88, 99-106.
- Dutra, M. G. (2009) Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: Um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás. Dissertação de Mestrado, Centro Universitário de Anápolis, 112.
- El-Sherbiny, G.M. (2015) Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Detected from the Root Canal Infection (Before and After) Root-Filled Teeth: An *in vitro* Study. *International Journal of Oral Science*. 3 (1), 4-9.
- Evangelista-Barreto, N.S., Carvalho, F.C.T., Vieira, R.H.S.F., Reis, C.M.F., Macrae, A., Rodrigues, D.P. (2010) Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41, 452-460.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018) The state of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016) The state of world fisheries and aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2005) Responsible use of antibiotics in aquaculture. Fisheries Technical paper, Roma, Italy.
- Figueiredo, H.C.P., Leal, C.A.G. (2008) Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 37, 8-14.
- Fontenelle, R.O.S., Morais, S.M., Brito, E.H.S., Kerntopf, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Tomé, A.R., Queiroz, M.G.R., Nascimento, N.R.F., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. (2007) Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59, 934-940.
- Franco, A.L.P., Oliveira, T.B., Ferri, P.H., Bara, M.T.F., Paula, J.R. (2007) Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (alfazema), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* L. (açafrão). *Revista Eletrônica de Farmácia*. 4 (2), 208-220.
- Fu, Y.W., Wang, B., Zhang, Q.Z., Xu, D.H., Liu, Y.M., Hou, T.L., Guo, S.Q. (2019) Efficacy and antiparasitic mechanism of 10-gingerol isolated from ginger *Zingiber*

- officinale* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp. *Veterinary Parasitology*. 265, 74–84.
- Fujimoto, R.Y., Vendruscolo, L., Schalch, S.H.C., Moraes, F.R. (2006) Avaliação de três diferentes métodos para o controle de monogenéticos e *Capillaria* sp. (Nematoda: Capillariidae), parasitos de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare* Liechtenstein, 1823). *Boletim do Instituto de Pesca*. 32 (2), 183-190.
- Garcia, F., Moraes, F.R. (2009) Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 31 (1), 17-21.
- Gastalho, S., Silva, G.J., Ramos, F. (2014) Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: Health care impact. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. 3 (1), 29-45.
- Goharrizi, L.Y., Zorriehzakra, M.E.J., Adel, M. (2015) The Study on Effect of Temperature Stress on Occurrence of Clinical Signs Caused by *Aeromonas hydrophila* in *Capoeta damascina* in *in vitro* Condition. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 3, 406-412.
- Gomes, G A., Monteiro, C.M.O., Senra, T.O.S., Zeringota, V., Calmon, F., Matos, R.S., Daemon, E., Gois, R.W.S., Santiago, G.M.P., Carvalho, M.G. (2012) Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 111, 2423-2430.
- Gomes, S.P., Favero, S. (2011) Avaliação de óleos essenciais de plantas aromáticas com atividade inseticida em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Scientiarum. Health Sciences*. 33 (2), 147-151.
- Goulding, M., Carvalho, M.L. (1982) Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia*. 1, 107-133.
- Grégio, A.M.T., Fortes, E.S.M., Rosa, E.A.R., Simeoni, R.B., Rosa, R.T. (2006) Ação antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. *Estudos de Biologia*. 28 (62), 61-66.
- Griffin, M.J., Goodwin, A.E., Merry, G.E., Liles, M.R., Williams, M.A., Ware, C., Waldbieser, G.C. (2013) Rapid quantitative detection of *Aeromonas hydrophila* strains associated with disease outbreaks in catfish aquaculture. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 25 (4), 473-481.

- Guerra, I.M.F., Fadanelli, R., Figueiró, M., Schreiner, F., Delamare, A.P.L., Wollheim, C., Costa, S.O.P., Echeverrigaray, S. (2007) *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: Prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38, 638-643.
- Guimarães, D.O., Momesso, L.S., Pupo, M.T. (2010) Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*. 33 (3), 667-679.
- Guimarães, L.G.L., Cardoso, M.G., Souza, R.M., Zacaroni, A.B., Santos, G.R. (2014) Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: Composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*. 45 (2), 267-275.
- Gull, I., Saeed, M., Shaukat, H., Aslam, S.M., Samra, Z.Q., Athar, A.M. (2012) Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 11 (8), 1-6.
- Hai, N.V. (2015) The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture*. 446, 88-96.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S. (2011) Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*. 317, 1-15.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S. (2010) Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 28, 354-361.
- Hashimoto, G.S.O., Marinho Neto, F., Ruiz, M.L., Acchile, M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L. (2016) Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture*. 450, 182-186.
- Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.R., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okihiro, M.S. (1992) Histopathologic Biomarkers. In: Huggett, R. J., Kimerli, R.A., Mehrle Jr, P.M., Bergman, H.L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Hinton, D. E., Laurén, D. J. (1990) Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *American Fisheries Society Symposium*. 8, 51- 66.

- Hirsch, D., Pereira Júnior, D.J.P., Logato, P.V.R., Piccoli, R.H., Figueiredo, H.C.P., (2006) Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. *Ciência e Agrotecnologia*. 30 (6), 1211-1217.
- Hounda, J.B.F., Jazet, P.M.D., Lazar, G., Raducanu, D., Caraman, I., Bassene, E., Boyom, F.F., Lazar, I.M. (2016) Spectral and chemometric analyses reveal antioxidante properties of essential oils from four Cameroonian *Ocimum*. *Industrial Crops and Products*. 80, 101–108.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2017). Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>.
- Ishikawa, N.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Lombardi, J.V. (2008) Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. *Archives of Veterinary Science*. 13 (1), 54-63.
- Izel, A.C.U., Crescencio, R., O’Sullivan, F.L.A., Chagas, E.C., Boijink, C.L., Silva, J.I. (2013) Produção intensiva de tambaqui em tanques escavados com aeração. Embrapa Amazônia Ocidental (Circular Técnica 39), Manaus.
- Khandagle, A.J., Tare, V.S., Raut, K.D., Morey, R.A. (2011) Bioactivity of essential oils of *Zingiber officinalis* and *Achyranthes aspera* against mosquitos. *Parasitology Research*. 109, 339-343.
- Kim, F.J.P., Silva, A.E.M., Silva, R.V.S., Kim, P.C.P., Acosta, A.C.A., Silva, S.M.B.C., Sena, M.J., Mota, R.A. (2018) Detecção de *Aeromonas* spp. e do gene de virulência aerolisina em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de mPCR. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 38 (9), 1731-1735.
- Kumar, G., Karthik, K.V., Rao, B. (2011) A Review on Pharmacological and Phytochemical Properties of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). *Journal of Pharmacy Research*. 4 (9), 2963-2966.
- Lagha, R., Abdallah, F.B., AL-Sarhan, B.O., Al-Sodany, Y. (2019) Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. *Molecules*. 24 (1161), 1-12.
- Leira, M.H., Lago, A.A., Viana, J.A., Cunha, L.T., Mendonça, F.G., Freitas, R.T.F. (2017) As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura. *Nutri Time*. 14 (2), 4982-4996.
- Leira, M. H., Lago, A.A., Botelho, H.A., Melo, C.C.V., Mendonça, F.G., Nascimento, A.F., Freitas, R.T.F. (2016) Principais infecções bacterianas na criação de peixes de

água doce do Brasil – uma revisão. Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública. 3 (1), 044-059.

- Lima, A.S., Milhomem, M.N., Monteiro, O.S., Arruda, A.C.P., Castro, J.A.M., Fernandes, Y.M.L., Maia, J.G.S., Costa-Junior, L.M. (2018) Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitology Research. 117, 59-65.
- Logambal, S.M., Michael, R.D. (2000). Immunostimulatory effect of Azadirachtin in *Oreochromis mossambicus* (Peters). Indian Journal of Experimental Biology. 38, 1092-1096.
- Lorenzi, H., Matos, F.J. (2008) Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.
- Lozano, I.L., Díaz, N.F., Muñoz, S., Riquelme, C. (2018) Antibiotics in Chilean Aquaculture: A Review. InTech. 25-44.
- Majolo, C., Pilarski, F., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.B., Chagas, E.C. (2018) Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil. Journal of Essential Oil Research. 1, 1-10.
- Majolo, C., Rocha, S.I.B., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.R. (2017) Chemical composition of *Lippia* spp. Essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture Research. 48, 2380-2387.
- Majolo, C., Nascimento, V.P., Chagas, E.C. (2014) Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 16 (3), 505-512.
- Malheiros, D.F., Maciel, P.O., Videira, M.N., Tavares-Dias, M. (2016) Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). Aquaculture. 455, 81-86.
- Martineli, T.M., Rossi Junior, O.D., Cereser, N.D., Cardozo, M.V., Kamimura, B.A., Nespolo, N.M., Pinto, F.R. (2010) Ocorrência de *Aeromonas* spp. em abatedouro bovino e sensibilidade a antimicrobianos. Arquivos do Instituto Biológico. 77 (2), 195-202.
- Martins, J.R., Neves, C.L.P., Pereira, W.V.S., Tonetti, O.A.O., Alvarenga, A.A. (2004) Armazenamento de sementes de Alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.). Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 16 (4), 789-793.

- Martins, M.L. (2004) Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.A. Sanidade de Organismos Aquáticos. Livraria Varela Editora, São Paulo.
- Mattos, S.H., Innecco, R., Marco, C.A., Araújo, A.V. (2007) Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais. Banco do Nordeste do Brasil. 1 (1), 61-63.
- Meneses, J.O., Couto, M.V.S., Sousa, N.C., Cunha, F.S., Abe, H.A., Ramos, F.M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., Maria, A.N., Carneiro, P.C.F., Fujimoto, R.Y. (2018) Efficacy of *Ocimum gratissimum* essential oil against the monogenean *Cichlidogyrus tilapiae* gill parasite of Nile tilapia. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 70 (2), 497-504.
- Moghaddam, M., Mehdizadeh, L. (2017) Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. Soft Chemistry and Food Fermentation. 379-419.
- Morales, M.R., Simon, J.E. (1996) New basil selections with compact inflorescences for the ornamental market. In: Janick, J. [eds.] *Progress in new crops*. Artington: ASHS Press.
- MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura (2013). Boletim Estatístico da pesca e Aquicultura-2011. Brasília: Brasil-Ministério da Pesca e Aquicultura.
- Nielsen, M.E., Hoi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y., Larsen, J.L. (2001) Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China?. Diseases of Aquatic Organisms. 46, 23-29.
- Nya, E.J., Austin, B. (2009) Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases. 32, 971-977.
- Oliveira, S.T., Veneroni-Gouveia G., Costa, M.M. (2012) Molecular characterization of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* obtained from fish. Pesquisa Veterinária Brasileira. 32 (8), 701-706.
- Oliveira, F.P., Lima, E.O., Siqueira Júnior, J. P., Souza, E. L., Santos, B. H. C., Barreto, H. M. (2006) Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. Revista Brasileira de Farmacognosia. 16 (4), 510-516.
- ONU - United nations, department of economic and social affairs. (2012) The United Nations, Population Division, Population Estimates and Projections Section.

- Ortí, G., Sivasundar, A., Dietz, K., Jégu, M. (2008) Phylogeny of the Serrasalmidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*. 31 (1), 343-351.
- Padalia, R.C., Verma, R.S., Chauhan, A. (2014) Analyses of organ specific variations in essential oils of four *Ocimum* species. *Journal of Essential Oil Research*. 26 (6), 409-419.
- Pádua, S.B., Sakabe, Neto, J.D., Sakabe, R., Claudiano, G.S., Chagas, E.C., Pilarski, F. (2013) Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 48, 1171-1174.
- Pandey, G., Sharma, M., Mandloi, A.K. (2012) Medicinal plants useful in fish diseases. *Plant Archives*. 12 (1), 1-4.
- Peixoto, L.J.S., Sá, M.C.A., Gordiano, L.A., Costa, M.M. (2012) *Aeromonas* spp.: Fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. *Arquivo do Instituto Biológico*. 79, 453-461.
- Pereira, C.A.M., Maia, J.F. (2007) Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.) *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27(3), 624-632.
- Pereira, E.L., Oliveira, A.F.A. (2016) A produção de antibióticos por processos fermentativos aeróbicos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. 14 (2), 1058-1078.
- Pilarski, F., Garcia, F., Sutili, F. (2017) Antibacterianos utilizados na aquicultura. In: Baldisserotto, B., Gomes, L.C., Heinzmann, B.M., Cunha, M.A. *Farmacologia aplicada a aquicultura*. Editora da UFSM, Santa Maria.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavare-Dias, M., Egami, M.I. (2013) Métodos para análise hematológica em peixes. *Eduem.Maringá*.
- Reginato, J.B., Leal, R.M.P. (2010) Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 34, 601-610.
- Reque, V.R., Moraes, J.E.R., Belo, M.A.A., Moraes, F.R. (2010) Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Aquaculture*. 300, 37-42.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. (2014) Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*. 433, 50-61.

- Ribeiro, S.C., Malheiros, D.F., Guiloiski, I.C., Majolo, C., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Assis, H.C.S., Tavares-Dias, M., Yoshioka, E.T.O. (2018) Antioxidants effects and resistance against pathogens of *Colossoma macropomum* (Serassalmidae) fed *Mentha piperita* essential oil. *Aquaculture*. 490, 29–34.
- Rodrigues-Soares, J.P., Jesus, G.F.A., Gonçalves, E.L.T., Moraes, K.N., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Belo, M.A.A., Jatobá, A., Mourino, J.L.P., Martins, M.L. (2018) Induced aerocystitis and hemato-immunological parameters in Nile tilapia fed supplemented diet with essential oil of *Lippia alba*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 55 (1), 1-12.
- Saath, K.C.O., Fachinello, A.L. (2018) Crescimento da Demanda Mundial de Alimentos e Restrições do Fator Terra no Brasil. *Revista de Economia e Sociologia Rural*. 56 (2), 195-212.
- Santos, R.B.S, Tavares-Dias, M. (2010) Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (Pisces, Doradidae) oriundos da bacia do médio Rio Solimões, Estado do Amazonas (Brasil), naturalmente parasitados. *Boletim do Instituto de Pesca*. 36, 283-292.
- Santos, C.P., Oliveira, T.C., Pinto, J.A.O., Fontes, S.S., Cruz, E.M.O., Arrigoni-Blank, M.F., Andrade T.M., Matos, I.L., Alves, P.B., Innecco, R., Blank, A.F. (2015) Chemical diversity and influence of plant age on the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. germplasm. *Industrial Crops and Products*. 76, 416–421.
- Schalch, S., Moraes, F.R. (2005) Distribuição sazonal de parasitos branquiais em diferentes espécies de peixes em pesque-pague do município de Guariba-SP, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 14 (4), 141-146.
- Schulter, E.P., Vieira Filho, J.E.R. (2017) Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Texto para discussão / Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - Brasília. Rio de Janeiro: Ipea.
- Schwaiger, J., Wande, R., Adm, S., Pawert, M., Honnen, W., Tribskorn, R. (1997) The use of histopathologic indicators to evaluate contaminant related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6, 75-86.
- Sebastião. F.A., Lemos, E.G.M., Pilarski, F. (2018) Development of an Absolute Quantitative Real-Time PCR (qPCR) for the Diagnosis of *Aeromonas hydrophila* Infections in Fish. *Acta Scientific Microbiology*. 1 (4), 23-29.

- Shakya, S.R. (2015) Medicinal uses of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) improves growth and enhances immunity in aquaculture. *International Journal of Chemical Studies*. 3(2), 83-87.
- Silva, A.L., Marcassi-Alves, F.C., Andrade-Talmelli, E.F., Ishikawa, C.M., Nagata, M.K., Rojas, N.E.T. (2009) Utilização de cloreto de sódio, formalina e a associação destes produtos no controle de ectoparasitas em larvas de tilápia (*Oreochromis niloticus*). *Boletim Instituto de Pesca*. 35(4), 597-608.
- Silva, B.C., Jatobá, A., Vieira, F.N., Mouriño, J.L.P., Bolívar, N., Seiffert, W.Q., Martins, M.L. (2013) Immunization of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*) against Motile *Aeromonas hydrophila* septicemia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 56 (1), 81-84.
- Silva, A.S.E., Lima, J.T.A.X., Blanco, B.S. (2012) Hematologia em peixes. *Revista Centauro*. 3 (1), 24-32.
- Silva, R.M.L., Rossi Junior, O.D., Costa, F.N., Chaves, N.P., Nascimento, D.L., Kamimura, B.A. (2010) *Aeromonas* spp. em água de pisciculturas da região da baixada ocidental maranhense. *Boletim do Instituto de Pesca*. 36 (3), 245-249.
- Snuossi, M., Trabelsi, N., Taleb, S.B., Dehmeni, A., Flamini, G., Feo, V. (2016) *Laurus nobilis*, *Zingiber officinale* and *Anethum graveolens* Essential Oils: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Bacteria Isolated from Fish and Shellfish. *Molecules*. 21 (1414), 1-20.
- Soares, B.V., Neves, L.R., Ferreira, D.O., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Gonçalves, R. A., Tavares-Dias, M. (2017) Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Veterinary Parasitology*. 234, 49–56.
- Soares, B.V., Neves, L.R., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Dias, M.K.R., Chagas, E.C., Tavares-Dias, M. (2016) Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture*. 452, 107–114.
- Sönmez, A.Y., Bilen, S., Albayrak, M., Yilmaz, S., Biswas, G., Hisar, O., Yanik, T. (2015) Effects of dietary supplementation of herbal oils containing 1, 8-cineole, carvacrol or pulegone on growth performance, survival, fatty acid composition, and liver and kidney histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 15, 813-819.

- Souza, M.L.R., Dourado, D.M., Machado, S.D., Buccini, D.F., Jardim, M.I.A., Matias, R., Correia, C., Ferreira, I.C. (2003) Análise da pele de três espécies de peixes: Histologia, morfometria e testes de resistência. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 32 (6), 1551-1559.
- Souza, W.M.A., Ramos, R.A.N., Alves, L.C., Coelho, M.C.O.C., Maia, M.B.S. (2010) Avaliação *in vitro* do extrato hidroalcoólico (EHA) de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrointestinais (Trichostrongylidae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 12 (3), 278-281.
- Spanghero, D.B.N., Spanghero, E.C.A.M., Pedron, J.S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Zaniboni-Filho, E. (2019) Peppermint essential oil as an anesthetic for and toxicity to juvenile silver catfish. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 54, 1-8.
- Suhet, M.I., Chocken-Iturrino, R.P., Amaral, L.A. (2011) Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ars Veterinaria*. 27, 36-44.
- Sutili, F.J., de Lima Silva, L., Gressler, L.T., Gressler, L.T., Battisti, E.K., Heinzmann, B.M., Vargas, A.C., Baldisserotto, B. (2015) Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: *in vitro* activity and their use in experimentally infected fish. *Journal of Applied Microbiology*. 119, 47-54.
- Talpur, A.D. (2014) *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquacultura*. 420–421, 71-78.
- Tavares, A.B., Cereser, N.D., Timm, C.D. (2014) Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. *Arquivos do Instituto Biológico*. 20 (10), 1-8.
- Tavares-Dias, M., Affonso, E.G., Oliveira, S.R., Marcon, J.L., Egami, M.I. (2008) Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. *Acta Amazonica*. 38, 799-806.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F.R. (2007) Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *Journal of Fish Biology*. 71, 383-388.
- Tavares-Dias, M., Lemos, J.R.G., Andrade, S.M.S., Aquino-Pereira, S.L. (2006) Ocorrência de ectoparasitos em *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characidae)

- cutivados em estação de piscicultura na Amazônia Central. *Comunicación Científica*. 726-731.
- Tavares-Dias, M. e Moraes, F.R. (2004) *Hematologia de peixes teleósteos*. 1ª ed. São Paulo, Ribeirão Preto.
- Tavares-Dias, M., Melo, J.F.B., Moraes, G., Moraes, F.R.M. (2002) Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do Jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*. 32 (4), 693-698.
- Tavares-Dias, M., Mariano, W.S. (2015) *Aquicultura no Brasil: Novas perspectivas*. Vol. 1. São Carlos: Pedro & João Editores.
- Tavechio, W.L.G., Guidelli, G., Portz, L. (2009) Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. *Boletim Instituto de Pesca*. 35 (2), 335-341.
- Teles, J. A. (2013) Estudo farmacocinético da enrofloxacin em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando ração medicada preparada com recobrimento polimérico. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 119.
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F. (2016) South american fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 10, 351-369.
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F. (2015) Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 38, 417-428.
- Veras, H.N.H., Rodrigues, F.F.G., Botelho, M.A., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M. (2014) Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the bacterium isolated from root canals. *The Scientific World Journal*. 1-5.
- Yang, W., Li, N., Li, M., Zhang, D., An, G. (2016) Complete genome sequence of fish pathogen *Aeromonas hydrophila* JBN2301. *Genome Announc*. 4 (1), 01615–01615.
- Zhang, X., Yang, W., Wu, H., Gong, X., Li, A. (2014) Multilocus sequence typing revealed a clonal lineage of *Aeromonas hydrophila* caused motile *Aeromonas septicemia* outbreaks in pond-cultured cyprinid fish in an epidemic area in central China. *Aquaculture*. 432, 1-6.
- Zhang, D., Xu, D.H., Shoemaker, C. (2016) Experimental induction of motile *Aeromonas septicemia* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by waterborne challenge with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Reports*. 3, 18–23.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* em juvenis de *Colossoma macropomum*.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* contra diferentes cepas da bactéria *Aeromonas hydrophila* e determinar sua composição química (Capítulo I);
2. Determinar o efeito dos óleos essenciais *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale*, por meio de banhos terapêuticos, sobre a sobrevivência, parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) infectado por *Aeromonas hydrophila* (Capítulo II);
3. Verificar o efeito dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* incorporados na dieta de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) sobre os parâmetros de desempenho zootécnico, hematológicos, bioquímicos e imunológicos, bem como sua resistência frente à infecção induzida por *A. hydrophila* (Capítulo III).

FORMATAÇÃO DA TESE EM CAPÍTULOS

Esta tese foi estruturada em três capítulos redigidos em forma de artigo científico. Os capítulos constam nas normas de seus respectivos periódicos de submissão. Capítulo I submetido ao periódico *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. Capítulo II redigido nas normas do periódico *Microbial Pathogenesis* e o Capítulo III redigido nas normas do periódico *Aquaculture*.

CAPÍTULO I

Antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against strains of *Aeromonas hydrophila*

Patrícia Castro Monteiro^a, Cláudia Majolo^b, Francisco Célio Maia Chaves^b, Humberto Ribeiro Bizzo^c, Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan^{a,b}, Edsandra Campos Chagas^{a,b*}

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo, Octávio 620, Coroado I, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brazil

^bEmbrapa Amazônia Ocidental, AM-010, CP 319, CEP 69010-970, Manaus, AM, Brazil.

^cEmbrapa Agroindústria de Alimentos, Avenida das Américas 29501, Bairro Guaratiba, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

*Corresponding author.

Edsandra Campos Chagas. Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM-010, Km 29, Caixa Postal 319, CEP: 69010-970, Manaus, Amazonas, Brazil. E-mail: edsandra.chagas@embrapa.br. Telephone: +55 92 3303-7975. Fax: +55 92 3303-7820

Artigo submetido ao Journal of Essential Oil Bearing Plants

Your manuscript ID is TEOP-2019-0111.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the essential oils of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* against 10 strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*), in addition to determine their chemical composition. Essential oils were obtained by hydrodistillation in a Clevenger apparatus and their chemical composition was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Antimicrobial activity of the oils was assayed by the broth microdilution method, establishing the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The major compounds in the oils were thymol (76.6%), *p*-cymene (6.3%) and β -caryophyllene (5.0%) for *L. sidoides*, eugenol (43.3%), 1,8-cineole (28.2%) and β -selinene (5.5%) for *O. gratissimum* and geranial (23.2%), neral (16.7%) and 1,8-cineole (15.8%) for *Z. officinale*. All essential oils evaluated showed bactericidal action against 10 strains of *A. hydrophila* with MIC and MBC ranging from 625 to 5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Among the essential oils evaluated, *L. sidoides* oil presented the best antimicrobial activity against *A. hydrophila* strains (MIC and MBC from 625 to 1.250 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Key words: *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum*, *Zingiber officinale*, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration.

Introduction

In the tambaqui (*Colossoma macropomum*) farming and other native fish species there are records of diseases outbreaks caused by bacteria, mainly *Aeromonas hydrophila*, which causes great damage in fish farming, by decreasing productivity, delaying fish growth and causing mortality worldwide ¹⁻⁴. These bacteria cause haemorrhagic septicaemia in fish and their occurrence is associated with excess organic matter in water supplies, stress and primary infections ^{1,2}. In Brazil, losses due to bacterial and parasitic diseases are estimated at 84 million dollars with direct and indirect costs ⁵.

For the treatment of bacterial diseases, several antibiotics has been employed. However, the indiscriminate use of them has contributed to the development of resistance ^{6,7}, which may lead to immunosuppression, risks to human and veterinary health, pollution of the environment, besides being able to affect the natural microbial communities ⁸⁻¹⁰. This problem has stimulated the research for antimicrobial compounds of natural origin and the use of essential oils has been established as a promising alternative ^{11,12}, with known bactericidal and bacteriostatic activities ¹³⁻¹⁵.

From aromatic plants, the leaves of *Lippia sidoides* are rich in essential oils containing thymol and carvacrol, which have antimicrobial activity against *A. hydrophila* ¹⁴. The essential oil of *Ocimum gratissimum* (clove basil) presents anesthetic and antimicrobial activities, due to the presence of the chemical component eugenol in different parts of the plant ¹⁵⁻¹⁷. The essential oil of *Zingiber officinale* (ginger) is known for its immunostimulating and antimicrobial properties ^{15,18,19}. It's essential oil is rich in geranial, neral, cineole, borneol, zingiberene and bisabolene ^{20,21}.

The aim of this study was to determine the chemical composition of the essential oils of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* and their antimicrobial activity against 10 strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Material and methods

Plant material and essential oil extraction

L. sidoides, *O. gratissimum* and *Z. officinale* specimens were grown in the Medical Plant Collection of Embrapa Amazônia Ocidental in Manaus, Amazonas, Brazil (Register of access to Genetic Heritage - AB13781). After harvest, the parts of the plants (leaves and inflorescences or rhizomes) were collected and dried at room temperature, in an open

shed, in the shade and then stored for essential oil hydrodistillation in a Clevenger apparatus for 2 hours. In each distillation, 500 g of leaves and inflorescences or rhizomes were used. The essential oils collected were stored at 4 °C until analysis.

Essential oils composition

The essential oils of *L. sidoides*, *O. gratissimum* and *Z. officinale* were analyzed by gas chromatography in an Agilent 7890A gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID) and a HP5-MS column (5% phenyl - 95% methylsiloxane, 30m x 0.25mm x 0.25mm). The essential oils were diluted to 1% in dichloromethane and 1.0 µL of this solution was added to the injector that operated in split mode (1:100) at 250 °C and the detector at 280 °C. The oven temperature was programmed to rise from 60-240 °C at 3 °C min⁻¹. The carrier gas used was hydrogen at a flow of 1.4 mL min⁻¹.

Gas chromatography-mass spectrometry was performed with an Agilent 5973N mass detector operated in electron ionization mode under the following conditions: ionization energy: 70 eV, with a scan mass range of 40-500 m z⁻¹. The sampling rate was 3.15 scans s⁻¹. The ion source was maintained at 230 °C, the mass analyzer at 150 °C and transfer line at 260 °C. All chromatographic conditions were the same as described for GC-FID. Helium was used as carrier gas with flow of 1.0 mL min. The generated data were analyzed using the MSD software.

The identification of the volatile components present in the essential oils were based on their mass spectra and those of the the library Wiley 6th ed., and by comparison of literature linear retention indices²² with those calculated according to Van den Dool and Kratz²³.

Antimicrobial activity

Isolation of fish pathogens

All strains of *A. hydrophila* were isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*), obtained from local fish farms (Rio Preto da Eva – AM, Brazil). The bacteria were isolated from kidneys of naturally infected fish and plated in Brain Heart Infusion Broth (BHI, Himedia, Mumbai, India). After 48 h (35 °C) of incubation, the bacterial growth was observed and the colonies were submitted to gram staining, catalase and oxidase tests followed by the biochemical tests (API 20E) for identification.

Microorganisms and culture conditions

The strains (248, 249, 284, 351, 432, 561, 562, 565, 568 and 570) were stored in BHI supplemented with 30% sterile glycerol at -80 °C at Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM. For reactivation, the strains were crooped in BHI for 24h at 35°C and then plated in Triptone Soy Agar (TSA, Himedia, Mubai, India) for purity assessment, accomplished by Gram staining and visualization under light microscope (1000x magnification).

Test of antimicrobial activity

The antimicrobial activity was determined using the broth microdilution method, following the descriptions of protocol M7-A6 of the Clinical and Laboratory Standards Institute, National Committee for Clinical Laboratory Standards ²⁴. Pre-prepared microdilutions were performed for each essential oil (*L. sidoides*, *O. gratissimum* and *Z. officinale*) at final concentrations of 10,000, 5,000, 2,500, 1,250, 625 and 312.5 µg mL⁻¹. In evaluating the antimicrobial effect, a medium without inoculum and essential oils was used as the negative control and the inoculum medium was used as the positive control, under the same conditions. Gentamicin sulfate (Inlab, Diadema, SP, Brazil) was used as a positive antimicrobial control with MIC values of 3.125 µg mL⁻¹.

To confirm the results, 0.5% triphenyl tetrazolium chloride in sterile aqueous solution was added to the wells of the plates. The mixture was incubated at 35 °C for 1 hour and was then read to confirm the growth of the microorganism. The results were established in terms of the minimum inhibitory concentration (MIC), which was defined as the lowest concentration that showed antimicrobial activity after 24 hours of incubation. The bactericidal action of the essential oil was evaluated through addition of 20 µL of the microbial culture that had been removed from wells with concentrations greater than or equal to the MIC. This material was inoculated onto Mueller-Hinton agar plates (Kasvi, Italy) and was incubated at 35 °C for 24 hours, following the recommendations of Majolo et al. ¹⁴. After incubation, the plates were read and minimal bacterial concentration (MBC) was defined as the lowest concentration without bacterial growth. All the assays were performed in triplicate. Strong activity was defined as MIC < 5,000 µg mL⁻¹ ²⁵.

Statistical analysis

Data on MIC and MBC were evaluated by ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$) to compare the action of the essential oil plant species evaluated against strains of *A. hydrophila*.

Results and discussion

Essential oils chemical composition

The chromatographic profiles of the essential oils (EO) of *L. sidoides*, *O. gratissimum* and *Z. officinale* are shown in Figures 1-3 and the chemical composition in Table 1.

The major compounds identified in the oil of *L. sidoides* were thymol (76.6%), followed by *p*-cymene (6.3%) and β -caryophyllene (5.0%). The others compounds were present in concentrations lower than 12.1% of the total of *L. sidoides*. Similar oil composition of *L. sidoides* was found by Santos et al.²⁶. Although the compound thymol was also the major compound of *L. sidoides* EO, and the other compounds vary in different studies²⁷⁻²⁹.

In the essential oil of *O. gratissimum* the eugenol (43.3%), 1,8-cineole (28.2%) and β -selinene (5.5%) were the major compounds. The others compounds were present in concentrations lower than 23.0% of the total *O. gratissimum* oil. These results are similar to described by Silva et al.³⁰, Boijink et al.¹⁷ and Bandeira Jr. et al.³¹, who also showed eugenol as the major component, although with values higher than those found in this study.

For the essential oil of *Z. officinale*, the major compounds were geranial (23.2%), neral (16.7%) and 1,8-cineole (15.8%). The others compounds were present in concentrations lower than 44.3% of the total of *Z. officinale* oil. Similar results were reported by Andrade et al.³², which identified geranial (25.06%), neral (16.47%) and 1,8-cineole (10.98%) as the main constituents. However, there are large differences in the major chemical compounds of *Z. officinale* EO, identified in other studies, such as Noori et al.³³, which identified α -zingiberene (24.96%) as the main constituent in *Z. officinale* oil, but it was found in a small proportion (2.1%) in this study.

In general, the difference in the composition and concentration of the essential oil components of plants of the same species may vary due to ecological factors and edaphoclimatic conditions^{32,34}. This is why it is fundamental to perform the composition

analysis of essential oils, since the compounds of the oils have a great influence on the antimicrobial activity, and each compound has a specific ability to disrupt or penetrate the bacterial structure³⁵.

Antimicrobial assays

The essential oils of *L. sidoides*, *O. gratissimum* and *Z. officinale* showed antibacterial activity against the 10 strains (248, 249, 284, 351, 432, 561, 562, 565, 568 and 570) of *A. hydrophila* isolated from tambaqui, with a variation in MIC and MBC values of 625 a 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Table 2). According to Bussmann et al.²⁵, MIC values below 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ are considered to have strong antimicrobial activity. The same pattern for determine strong activity is adopted by Sartoratto et al.³⁶, who also reports that MIC values above 15,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ characterize weak antimicrobial activity. Therefore, all essential oils evaluated in this study had strong to moderate action against all strains of *A. hydrophila*.

The essential oil of *L. sidoides* showed the best antimicrobial activity against the strains of *A. hydrophila* evaluated in this study, with MIC and MBC values ranging from 625 to 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Majolo et al.¹⁴ studying the antimicrobial effect of *Lippia* sp. (*L. alba*, *L. sidoides* and *L. origanoides*) observed that the essential oil of *L. sidoides* was the most effective, with MIC and MBC values of 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *A. hydrophila*. For gram positive bacteria as *Streptococcus agalactiae*, the MIC value of essential oil of *L. sidoides* was 312.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ¹⁵. Although these results make the *L. sidoides* oil a promising antimicrobial agent. This is due to the fact that its main chemical constituent is thymol, which is a phenolic compound that excercises antimicrobial activity, mediated by the functional group acting on the outer membrane of the bacterium, affecting the permeability and/or fluidity of the membrane³⁷. According to Sharififar et al.³⁸, thymol presents great bioactivity on Gram negative bacteria, due to their higher affinity for the lipid structure of the surrounding membrane.

For *O. gratissimum* essential oil, the inhibition of *A. hydrophila* growth was achieved at concentrations (MIC and MBC from 1,250 to 5,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) higher than that of *L. sidoides* (Table 2). The MIC and MBC values of *O. gratissimum* oil against *A. hydrophila*, isolated from silver catfish (*Rhamdia quelen*) ranged from 400 to 1,600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ³¹, indicating that the isolates from silver catfish is more sensitive than those evaluated in this study. The eugenol, which has a well known antimicrobial activity³⁹, is

the main constituent of *O. gratissimum* EO. The mechanism of action of eugenol involves the rapid inhibition of the bacterial metabolism of energy^{37,40}. Several authors report differences regarding the sensitivity of eugenol's antimicrobial action against different microorganisms. Scherer et al.⁴¹ evaluated the activity of different essential oils, such as *Caryophyllus aromaticus*, whose main compound is eugenol, against the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurim*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Clostridium perfringens* and found moderate to strong antimicrobial action, which is similar to the results obtained in this study. These findings are in agreement with those of Siddique et al.⁴², who also observed moderate antimicrobial activity of *Melaleuca armillares* oil (2-8 $\mu\text{g mL}^{-1}$), where eugenol is the major component. Another chemical component evidenced in this study for *O. gratissimum* essential oil was 1,8-cineole. The presence of 1,8-cineole in the essential oil of *Litsea cubeba* exerts strong antimicrobial activity (2-9 mg mL^{-1})⁴³.

In this study, the essential oil of *Z. officinale* inhibited the growth of different *A. hydrophila* strains with concentrations of MIC and MBC varying from 1,250 to 5,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Table 2). Compared to *L. sidoides* EO, ginger showed moderate to weak antimicrobial activity. The weak antibacterial activity of this oil is attributed to the oxygenated chemical structures such as borneol, camphor, 1,8 cineole, α -pinene, camphone, identified in the essential oil of *Z. officinale*, as reported by Nazzaro et al.³⁷. Despite this, there is record of antimicrobial activity of ginger against gram-negative and gram-positive bacteria^{44,45}. For gram-positive bacteria such as *Streptococcus agalactiae*, the oil of *Z. officinale* has antimicrobial action with MIC of 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and MCB of 833.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ¹⁵, evidencing that Gram positive bacteria are more susceptible to the activity of essential oils than Gram negative bacteria^{37,46,47}.

The results of this study highlight the potential of *L. sidoides*, *O. gratissimum* and *Z. officinale* essential oils as effective antimicrobials against different strains of *A. hydrophila* isolated from tambaqui (*C. macropomum*). With the promising results of *L. sidoides* oil, more studies with this essential oil or their components, as thymol, shall be conducted, among which the evaluation of the toxicity of these oils and compounds to fish, as well as tambaqui which is the main native species farmed in Brazil, thus contributing to the establishment of a therapeutic protocol for the control of bacterial diseases in fish.

Conclusion

The essential oils of *L. sidoides*, *O. gratissimum* and *Z. officinale* has bactericidal action against 10 strains of *A. hydrophila*. *L. sidoides* oil has the best antimicrobial activity (MIC and MBC ranging from 625 to 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and should be evaluated for the control of bacterial fish diseases.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

To Embrapa - Brazilian Agricultural Research Corporation (#MP2 02.12.01.020.00.00), CNPq - National Council for Scientific and Technological Development (#485993/2013-9) and Amazonas Research Foundation – FAPEAM (#PPP 392/2012) for financial support. To Dr. Marcelo Róseo de Oliveira, from Embrapa Amazônia Ocidental, for the assistance in distilling the essential oils. P. C. Monteiro received PhD. fellowship from FAPEAM.

References

1. **Austin, B.; Austin, D. A. (2007).** Bacterial fish pathogens. Springer-Science, Chichester, UK.
2. **Sebastião, F.A., Macedo Lemos, E.G., Pilarski, F. (2018).** Development of an Absolute Quantitative Real-Time PCR (qPCR) for the Diagnosis of *Aeromonas hydrophila* Infections in Fish. Acta Scientific Microbiology. 1: 23-29.
3. **Sebastião, F.A., Furlan, L.R., Hashimoto, D.T., Pilarski, F. (2015).** Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. Advances in Microbiology. 5: 409-424.
4. **Ariede, R.B., Freitas, M.V., Hata, M.E., Mastrochirico-Filho, V.A., Pilarski, F.A., Batlouni, S.R., Porto-Foresti, F., Hashimoto, D.T. (2018).** Microsatellites associated with growth performance and analysis of resistance to *Aeromonas hydrophila* in tambaqui *Colossoma macropomum*. Frontiers in Genetics. 9: 1-8.
5. **Tavares-Dias, M., Martins, M.L. (2017).** An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. Journal of Parasitic Diseases. 41: 913-918.

6. **Peixoto, L.J.S., Sá, M.C.A., Gordiano, L.A., Costa, M.M. (2012).** *Aeromonas* spp.: Fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. *Arquivo do Instituto Biológico*. 79: 453-461.
7. **Swathy, J.S., Mishra, P., Thomas, J., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2018).** Antimicrobial potency of high-energy emulsified black pepper oil nanoemulsion against aquaculture pathogen. *Aquaculture*. 491: 210-220.
8. **Cabello, F.C. (2006).** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. 8: 1137-1144.
9. **Suhel, M.I., Chocken-Iturrino, R.P., Amaral, L.A. (2011).** Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ars Veterinaria*. 27: 36-44.
10. **Grenni, P., Ancona, V., Caracciolo, A.B. (2018).** Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*. 136: 25-39.
11. **Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. (2014).** Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*. 433: 50–61.
12. **Tavares-Dias, M. (2018).** Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquatic Living Resources*. 31: 2-11.
13. **Souza, R.C, Costa, M.M., Basldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Schmidt, D., Caron, B.O., Copatti, C.E. (2017).** Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. *Microbial Pathogenesis*. 113: 29-33.
14. **Majolo, C., Rocha, S.I.B., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.R. (2017).** Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*. 48: 2380-2387.
15. **Majolo, C., Pilarski, F., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.B., Chagas, E.C. (2018).** Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil. *Journal of Essential Oil Research*. 1: 1-10.
16. **Aguiar, J.J.S., Sousa, C.P.B., Araruna, M.K.A., Silva, M.K.N., Portelo, A.C., Lopes, J.C., Lopes, J.C., Carvalho, V.R.A., Figueredo, F.G., Bitu, V.C.N., Coutinho, H.D.M., Miranda, T.A.S., Matias, E.F.F. (2015).** Antibacterial and

- modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. *European Journal of Integrative Medicine*. 7: 151-156.
17. **Boijink, C.L., Queiroz, C.A., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Inoue, L.A.K.A. (2016).** Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture*. 457: 24-28.
 18. **El-Sherbiny, G.M. (2015).** Antimicrobial susceptibility of bacteria detected from the root canal infection (before and after) root-filled teeth: An in vitro study. *International Journal of Dental Science and Research*. 3: 4-9.
 19. **Majolo, C., Nascimento, V.P., Chagas, E.C. (2014).** Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 16: 505-512.
 20. **Golebiowski, M., Ostrowski, B., Paszkiewicz, M., Czerwicka, M., Kumirska, J., Halinki, L., Malinski, E., Stepnowski, P. (2008).** Chemical composition of commercially available essential oils from blackcurrant, ginger and peppermint. *Chemistry of Natural Compounds*. 44: 794-796.
 21. **Kiran, C.R., Chakka, A.K., Padmakumari Amma, K.P., Nirmala Menon, A., Sree Kumar, M.M., Venugopalan, V.V. (2013).** Essential oil composition of fresh ginger cultivars from North-East India. *Journal of Essential Oil Research*. 25: 380-387.
 22. **Adams, R.P. (2007).** Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
 23. **Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J.A. (1963).** Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*. 11: 463-471.
 24. **National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003).** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A6. Wayne, PA, USA.
 25. **Bussmann, R.W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirre, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhlman, A., Townesmith, A., Effio-Carbajal, J., Frías-Fernandez, F., Benito, M. (2010).** Minimum inhibitory concentrations of

- medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. 132: 101-108.
26. **Santos, A.A., Oliveira, B.M.S., Melo, C.R., Lima, A.P.S., Santana, E.D.R., Blank, A.F., Picanço, M.C., Araújo, A.P.A., Cristaldo, P.F., Bacci, L. (2017).** Sub-lethal effects of essential oil of *Lippia sidoides* on drywood termite *Cryptotermes brevis* (Blattodea: Termitoidea). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 145: 436-441.
 27. **Fontenelle, R.O.S., Morais, S.M., Brito, E.H.S., Kerntopf, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Tomé, A.R., Queiroz, M.G.R., Nascimento, N.R.F., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. (2007).** Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59: 934-940.
 28. **Oliveira, A.P., Santana, A.S., Santana, E.D.R., Lima, A.P.S., Faro, R.R.N., Nunes, R.S., Lima, A.D., Blank, A.F., Araújo, A.P.A., Cristaldo, P.F., Bacci, L. (2017).** Nanoformulation prototype of the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol to population management of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial Crops and Products*. 107: 198-205.
 29. **Veras, H.N.H., Rodrigues, F.F.G., Botelho, M.A., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M. (2017).** Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the thymol. *Arabian Journal of Chemistry*. 10: 2790–2795.
 30. **Silva, L.L., Parodi, T.V., Reckziegel, P., Garcia, V.O., Burger, M.E., Baldisserotto, B., Malmann, C.A., Pereira, A.M.S., Heinzmann, B.M. (2012).** Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*. 350-353: 91-97.
 31. **Bandeira Jr, G., Pês, T.S., Saccol, E.M.H., Sutili, F.J., Rossi Jr, W., Murari, A.L., Heinzmann, B.M., Pavanato, M.A., Vargas, A.C., Silva, L.L., Baldisserotto, B. (2017).** Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. *Industrial Crops and Products*. 97: 484-491.
 32. **Andrade, M.A., Cardoso, M.G., Batista, L.R., Mallet, A.C.T., Machado, S.M.F. (2012).** Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: Composition, antioxidant and antibacterial activities. *Revista Ciência Agronômica*. 43: 399-408.

33. **Noori, S., Zeynali, F., Almasi, H. (2018).** Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. *Food Control*. 84: 312-320.
34. **Marcial, G., Lampasona, M.P., Veja, M.I., Lizarraga, E., Viturro, C.I., Slanis, A., Juarez, M.A., Elechosa, M.A., Catalan, C.A.N. (2016).** Intraspecific variation in essential oil composition of the medicinal plant *Lippia integrifolia* (verbenaceae) evidence for five chemotypes. *Phytochemistry*. 122: 203–212.
35. **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils - A review. *Food Chemistry Toxicology*. 46: 446–475.
36. **Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., Rehder, V.L.G. (2004).** Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 275-280.
37. **Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L., Coppola, R., Feo, V. (2013).** Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 6: 1451–1474.
38. **Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M. (2007).** *In vitro* evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*. 18: 800-805.
39. **Zhang, L.J., Xue, Y., Zhang, C.R., Hu, S.H. (2013).** Antibacterial and anti-inflammatory effects of eucalyptol. *Chinese Journal of Veterinary Drug*. 3: 1–8.
40. **Gill, A.O., Holley, R.A. (2004).** Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied Environmental Microbiology*. 70: 5750–5755.
41. **Scherer, R., Wagner, R., Duarte, M.C.T., Godoy, H.T. (2009).** Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 11: 442-449.
42. **Siddique, S., Parveen, Z., Firdaus-e-Bareen, Chaudhary, M.N., Mazhar, S., Nawaz, S. (2017).** The essential oil of *Melaleuca armillaris* (Sol. ex Gaertn.) Sm. leaves from Pakistan: A potential source of eugenol methyl ether. *Industrial Crops and Products*. 109: 912-917.

43. **Nguyen, H.V., Meile, J.C., Lebrun, M., Caruso, D., Chu-Ky, S., Sarter, S. (2018).** *Litsea cubeba* leaf essential oil from Vietnam: chemical diversity and its impacts on antibacterial activity. *Journal of Applied Microbiology*. 66: 207-214.
44. **Sivasothy, Y., Chong, W.K., Hamid, A., Eldeen, I.M., Sulaiman, S.F., Awang, K. (2011).** Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. *Food Chemistry*. 124: 514–517.
45. **Debbarma, J., Kishore, P., Nayak, B.B., Kannuchamy, N., Gudipati, V. (2013).** Antibacterial activity of ginger, eucalyptus and sweet orange peel essential oil on fish-borne bacteria. *Journal of Food Processing and Preservation*. 37: 1022–1030.
46. **Dorman, H.J.D., Deans, S.D. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 308-316.
47. **Lima, R.K., Cardoso, M.G., Andrade, M.A., Guimarães, P.L., Batista, L.R., Nelson, D.L. (2012).** Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 89: 523–528.

Fíguas e Tabelas

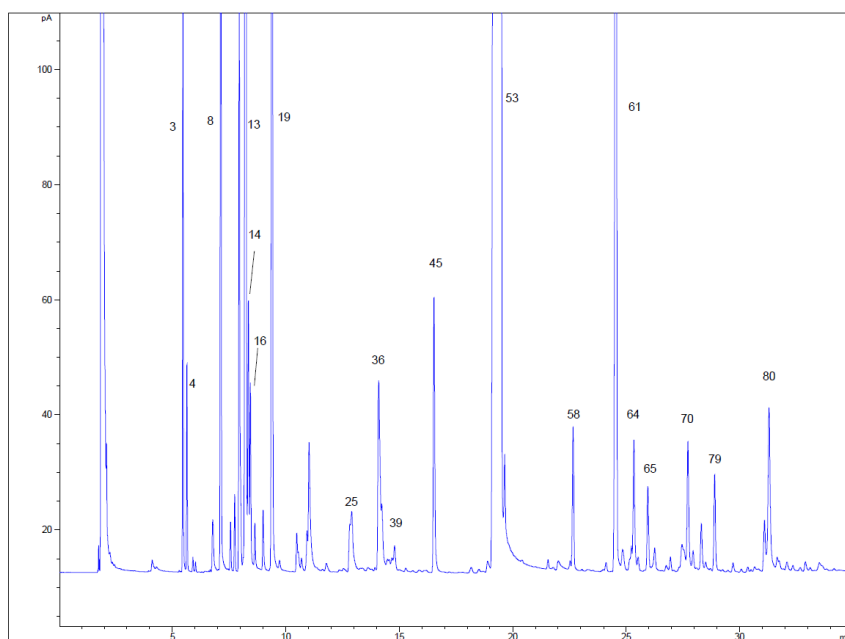


Figure 1. GC chromatogram of essential oil from *Lippia sidoides*.

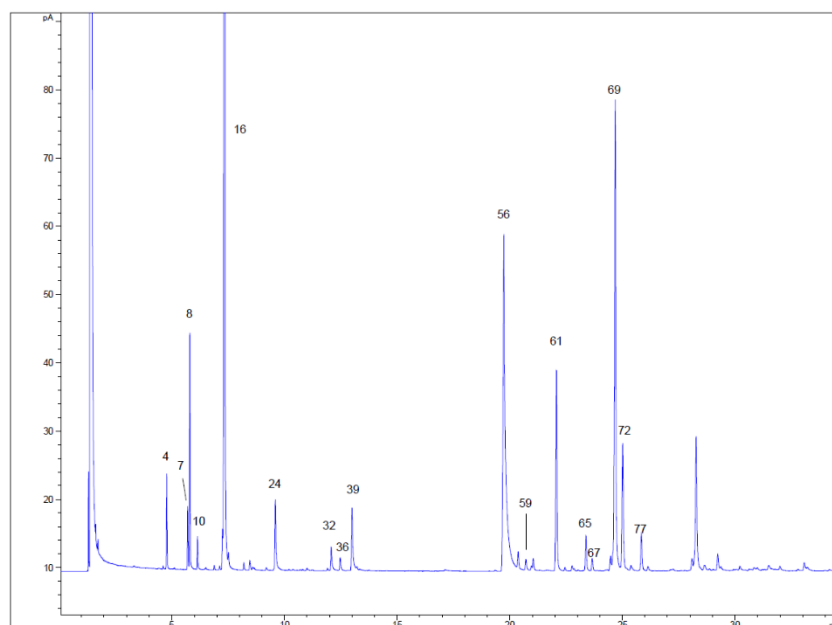


Figure 2. GC chromatogram of essential oil from *Ocimum gratissimum*.

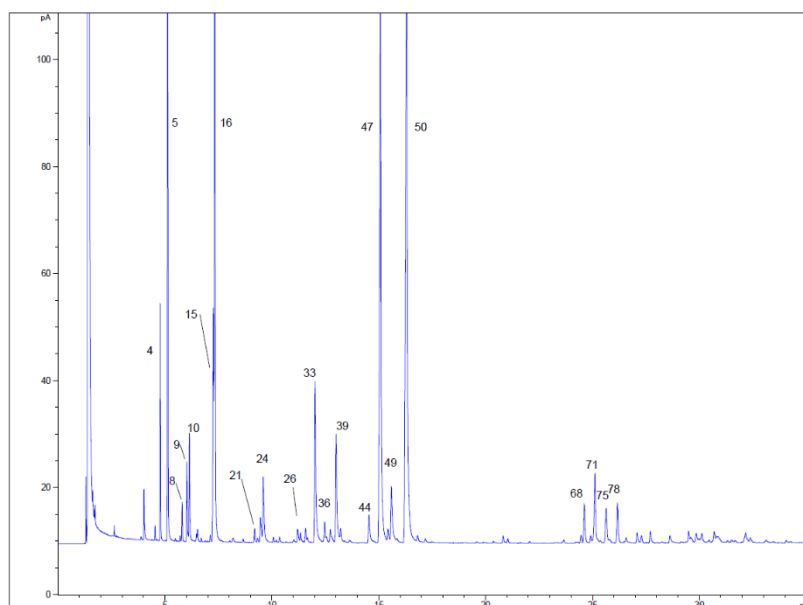


Figure 3. GC chromatogram of essential oil from *Zingiber officinale*.

Table 1. Chemical composition (%) of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* essential oils.

Components	<i>L.</i> <i>sidoides</i>	<i>O.</i> <i>gratissimum</i>	<i>Z.</i> <i>officinale</i>	LRI _{lit}	LRI _{exp}
1 2-heptanone	-	-	1.0	889	890
2 tricyclene	-	-	0.3	921	922
3 α -thujene	0.3	-	-	924	929
4 α -pinene	0.1	-	2.9	932	932
5 camphene	-	-	11.3	946	947
7 sabinene	-	0.7	-	969	975
8 β -pinene	-	2.8	0.6	974	976
9 6-methyl-5-hepten-2-one	-	-	1.2	981	985
10 myrcene	1.1	0.7	1.8	988	988
11 α -phellandrene	-	-	0.3	1002	1005
12 α -terpinene	0.7	-	-	1014	1019
13 <i>p</i> -cymene	6.3	-	-	1020	1022
14 limonene	0.4	-	-	1024	1025
15 β -phellandrene	-	-	4.0	1025	1028
16 1,8-cineole	0.7	28.2	15.8	1026	1030
17 (<i>Z</i>)-ocimene	-	3.7	-	1032	1038
19 γ -terpinene	2.0	-	-	1054	1061
21 terpinolene	-	-	0.3	1086	1088
24 linalool	-	1.3	1.8	1095	1100
25 ipsdienol	0.6	-	-	1140	1148

26	camphor	-	-	0.4	1141	1142
28	citronellal	-	-	0.3	1148	1152
32	δ -terpineol	-	0.4	-	1162	1166
33	borneol	-	-	4.3	1165	1164
35	umbelulone	0.2	-	-	1167	1176
36	terpinen-4-ol	1.0	0.4	0.6	1174	1178
37	(<i>E</i>)-isocitral	-	-	0.5	1177	1182
39	α -terpineol	0.2	1.1	2.8	1186	1190
40	myrtenal	-	-	0.5	1195	1190
43	citronellol	-	-	1.0	1223	1228
45	thymol methyl ether	1.0	-	-	1232	1236
47	neral	-	-	16.7	1235	1242
49	geraniol	-	-	1.9	1249	1254
50	geranial	-	-	23.2	1264	1272
53	thymol	76.6	-	-	1289	1296
56	eugenol	-	43.3	-	1357	1357
58	α -copaene	0.4	-	-	1374	1375
59	β -bourbonene	-	0.9	-	1387	1381
60	β -elemene	-	0.8	-	1389	1389
61	(<i>E</i>)-caryophyllene	-	3.7	-	1417	1415
62	β -caryophyllene	5.0	-	-		1417
64	aromadendrene	0.4	-	-	1439	1436
65	α -humulene	0.3	0.6	-	1452	1450
67	γ -muurolene	-	0.9	-	1478	1477
68	<i>ar</i> -curcumene	-	-	1.0	1479	1481
69	β -selinene	-	5.5	-	1489	1482
70	ledene	0.3	-	-		1492
71	α -zingiberene	-	-	2.1	1493	1494
72	α -selinene	-	1.7	-	1498	1496
75	(<i>E,E</i>)- α -farnesene	-	-	1.2	1505	1508
77	7- <i>epi</i> - α -selinene	-	0.4	-	1520	1513
78	β -sesquiphellandrene	-	-	1.1	1521	1522
79	δ -cadinene	0.3	-	-	1522	1521
80	caryophyllene oxide	0.7	-	-	1582	1572
Total identified		98.6	97.1	98.9		

Retention indices in DB-5MS.

LRI_{calc}: Calculated linear retention indices, according to Van den Dool and Kratz (1963).

LRI_{lit}: Literature linear retention indices from Adams (2007).

Table 2. Antibacterial activity of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* essential oils on *Aeromonas hydrophila* strains.

Strains	<i>L. sidoides</i>		<i>O. gratissimum</i>		<i>Z. officinale</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
248	625 ^b	625 ^b	2,500 ^a	5,000 ^a	2,500 ^a	2,500 ^a
249	1,250 ^b	1,250 ^b	5,000 ^a	5,000 ^a	2,500 ^a	5,000 ^a
254	625 ^b	625 ^b	2,500 ^a	2,500 ^a	2,500 ^a	2,500 ^a
351	1,250 ^b	1,250 ^b	2,500 ^a	2,500 ^a	2,500 ^a	2,500 ^a
432	1,250 ^b	1,250 ^b	5,000 ^a	5,000 ^a	5,000 ^a	5,000 ^a
561	625 ^b	625 ^b	1,250 ^a	1,250 ^a	1,250 ^a	1,250 ^a
562	1,250 ^b	1,250 ^b	2,500 ^a	2,500 ^a	2,500 ^a	2,500 ^a
568	1,250 ^b	1,250 ^b	5,000 ^a	5,000 ^a	5,000 ^a	5,000 ^a
569	625 ^b	625 ^b	1,250 ^a	1,250 ^a	1,250 ^a	1,250 ^a
570	625 ^b	625 ^b	5,000 ^a	5,000 ^a	5,000 ^a	5,000 ^a

Note: Values with different letters within a column are significantly different according to Tukey test ($p < 0.05$). MIC= minimum inhibitory concentration, MBC= minimum bactericidal concentration (in $\mu\text{g mL}^{-1}$). The MIC of gentamicin sulfate for all isolates was $3.125 \mu\text{g mL}^{-1}$.

CAPÍTULO II

Efeito dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* sobre o tambaqui (*Colossoma macropomum*) infectados com *Aeromonas hydrophila*

Patrícia Castro Monteiro^a; Maria Inês Braga de Oliveira^{a,b}; Franmir Rodrigues Brandão^a; Caio Francisco Santana Farias^c; Cláudia Majolo^d; Marcelo Róseo de Oliveira^d; Francisco Célio Maia Chaves^d; Humberto Ribeiro Bizzo^d; Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan^{a,d} Edsandra Campos Chagas^{a,d}

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas/UFAM, Manaus, AM, Brazil.

^bDepartamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFAM, Manaus, AM, Brazil.

^cUninorte-Laureate International Universities, Manaus, AM, Brazil

^dEmbrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brazil

^eEmbrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Artigo elaborado nas normas do periódico Microbial Pathogenesis

Resumo

O presente estudo avaliou o efeito dos óleos essenciais (OE) de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* sobre a sobrevivência, parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) infectado com *Aeromonas hydrophila*. Após aclimação, os peixes foram inoculados com *A. hydrophila*, e então submetidos a banhos terapêuticos de 60 minutos durante 5 dias consecutivos. Os tratamentos, aplicados via banhos, foram: controle positivo (infectado com *A. hydrophila* e sem adição de OE); controle negativo (infectado com *A. hydrophila* e adição de 10 mg L⁻¹ de gentamicina); 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ de OE *L. sidoides*; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de OE *O. gratissimum* e 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de OE *Z. officinale*, cada um com três repetições, sendo a sobrevivência dos peixes registrada durante 10 dias, posteriores à aplicação dos banhos. A maior taxa de sobrevivência de tambaquis foi alcançada pelo grupo tratado com 5,0 mg L⁻¹ de OE *O. gratissimum* (89,5%), valores próximos aos obtidos no grupo controle negativo. Já com 5,0 mg L⁻¹ do OE de *L. sidoides* a

sobrevivência foi 75,0%, e para os demais tratamentos com OE os valores de sobrevivência foram próximos ou abaixo do registrado para o grupo controle positivo (70,8%). Na avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, foi observado redução nos valores de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos em tambaquis expostos aos OE *L. sidoides* e *Z. officinale* em relação aos grupos controle, entretanto não houve alteração significativa nos valores de glicose plasmática, proteínas totais e das enzimas aminotransferases (aspartato e alanina aminotransferase), entre os tratamentos avaliados. Na análise histopatológica do tecido hepático de tambaquis infectados com *A. hydrophila*, após banhos com OE, foi observada a ocorrência de danos que variaram de leves a moderados. Os OE de *O. gratissimum* e *L. sidoides*, aplicados via banhos, promoveram melhor sobrevivência de tambaquis infectados com *A. hydrophila*, entretanto estratégias adicionais são necessárias para o uso destes óleos essenciais como antibacteriano.

Palavras-chave: plantas medicinais, banho terapêutico, hematologia, histologia, piscicultura

Abstract

The present study evaluated the effect of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* essential oils (EO) on survival, hematological, biochemical and histopathological parameters of tambaqui (*Colossoma macropomum*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Therefore, after acclimatization, the fish were inoculated with *A. hydrophila*, and then subjected to 60-minute therapeutic baths for 5 consecutive days. The treatments, applied via baths, were: positive control (infected with *A. hydrophila* and no addition of EO); negative control (infected with *A. hydrophila* and addition of 10 mg L⁻¹ gentamicin); 2.5 and 5.0 mg L⁻¹ EO *L. sidoides*; 5.0 and 10.0 mg L⁻¹ EO *O. gratissimum*, 5.0 and 10.0 mg L⁻¹ EO *Z. officinale*, each with three replications, the fish survival was recorded for 10 days, after the application of the baths. The highest survival rate of tambaqui was achieved by the group treated with 5.0 mg L⁻¹ EO *O. gratissimum* (89.5%), values close to those obtained in the negative control group. Already with 5.0 mg L⁻¹ of the *L. sidoides* EO the survival was 75.0%, and for the other treatments with EO the survival values were close to or below those registered for the positive control group (70.8%). In the evaluation of hematological and biochemical parameters, it was observed a reduction in hematocrit, hemoglobin and erythrocyte number in tambaqui exposed to EO *L. sidoides* and *Z. officinale* in relation to control groups, however there was no significant change in values of plasma glucose, total proteins and enzymes aminotransferases (aspartate and alanine aminotransferase), among the evaluated treatments. Histopathological analysis of liver tissue of *A. hydrophila* infected tambaqui after EO baths showed mild to moderate damage. *O. gratissimum* and *L. sidoides* EOs, applied via baths, promoted better survival of tambaqui infected with *A. hydrophila*, however additional strategies are required for the use of these essential oils as antibacterial.

Keyword: medicinal plants, therapeutic bath, hematology, histology, fish farming

Introdução

O crescimento da piscicultura tem sido contínuo nos últimos anos, isso porque o consumo de pescado representa uma das principais fontes de proteínas e nutrientes, essenciais à saúde humana [1]. Dentre as principais espécies cultivadas destaca-se o tambaqui (*Colossoma macropomum*), amplamente cultivado no Brasil principalmente na região norte [2,3], que conta com tecnologias para produção de alevinos, apresenta bons índices zootécnicos em ambientes de confinamento, além de um amplo conhecimento sobre as práticas de manejo [4].

Com a intensificação dos sistemas de produção praticados no Brasil, entres relacionados ao manejo sanitário dos peixes têm sido observados, aumentando sua susceptibilidade a agentes infecciosos [5]. Diante desta problemática, o uso indiscriminado e contínuo de antibióticos nas pisciculturas tem sido observado, com a finalidade de reduzir problemas relacionados às questões sanitárias, como as causadas pela bactéria *Aeromonas hydrophila*, reconhecida como um dos principais patógenos oportunistas que causam doenças em peixes cultivados como o tambaqui, e o uso *off label* desses antibióticos tem resultando em efeitos adversos, como resistência a drogas, imunossupressão, contaminação ambiental e riscos à saúde humana [6–11], gerando consequentes perdas econômicas ao setor pesqueiro [5,12].

Uma alternativa promissora e que tem gerando resultados expressivos na aquicultura consiste no uso de plantas medicinais, que demonstram exercer inúmeras atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, antioxidante, antiparasitária, entre outras, além de poder se tornar uma alternativa de produtos ecologicamente seguros [13–16]. Desta forma, o uso de óleos essenciais (OE) de plantas medicinais e seus compostos biologicamente ativos vêm crescendo na aquicultura, bem como se solidificando nas indústrias de insumos farmacêuticos, agroalimentícias, perfumaria e cosméticos [15–20].

Dentre as espécies de plantas medicinais estudadas destacamos *Lippia sidoides* (Verbenaceae), conhecida como alecrim pimenta, é aromática e medicinal, típica do nordeste do Brasil. Suas folhas e flores produzem óleo essencial com alto teor em timol e cravacol, dois terpenos fenólicos dotados de forte atividade antimicrobiana, inseticida, larvicida e fungicida [14,21]. Outra espécie é *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae), comumente conhecida como alfavaca-cravo, originária da África e subspontânea no Brasil, tem o eugenol como o principal constituinte presente em seu óleo essencial [22–24]. Vários estudos comprovam seu efeito como antibacteriano frente bactérias gram-positivas e gram-negativas [14,25–27]. A espécie *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) é

uma erva rizomática originária do sudoeste da Ásia, popularmente conhecida com gengibre, é amplamente comercializada em função de seu emprego alimentar e industrial, com atividades anti-inflamatória, larvicida, repelente e antibacteriana descritas[14,28,29].

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* sobre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) infectado com *Aeromonas hydrophila*.

Material e Métodos

Extração e caracterização química dos óleos essenciais

Espécimes de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* (Registro de Acesso ao Patrimônio Genético - AB13781) foram cultivados no Setor de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brasil. Para extração do óleo essencial, foram coletadas folhas, inflorescências e rizomas dessas plantas, foram secas à temperatura ambiente e após a obtenção dos óleos pelo processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger por 2 horas. Os óleos essenciais obtidos foram analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas na Embrapa Indústria de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil) para determinar sua composição química, segundo Potzernheim et al. [30].

Aclimação dos peixes

Os juvenis de tambaqui (n= 384, $10,39 \pm 0,76$ g e $40,26 \pm 3,27$ cm) foram mantidos em 24 tanques de fibra de vidro de 350 L (16 peixes por tanque) supridos com recirculação de água e aeração constante. Os peixes foram aclimatados as condições do tanque durante 30 dias e alimentados com dieta contendo 32% de PB duas vezes ao dia, até saciedade aparente.

Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados diariamente durante o ensaio e os valores foram: temperatura $29,01 \pm 0,58$ °C, oxigênio dissolvido de $6,59 \pm 0,52$ mg L⁻¹ (YSI Pro20, YSI Inc., EUA) e pH $7,44 \pm 0,28$ (YSI Medidor digital de pH F-1100, YSI Inc., EUA). A cada 15 dias foram medidas a alcalinidade ($17,4 \pm 0,48$ mg L⁻¹) e a amônia total ($0,46 \pm 0,08$ mg L⁻¹), utilizando titulação com EDTA e endofenol, respectivamente [31].

Inoculação de *Aeromonas hydrophila*

A bactéria *A. hydrophila* (ATCC 7966) foi cultivada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) a 35 °C por 24 h no Laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM. Em seguida, amostras do crescimento bacteriano foram diluídas em solução salina estéril e a absorbância ajustada a 550 nm em espectrofotômetro para obtenção de contagem de células viáveis de $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Essa concentração foi estabelecida em ensaios anteriores [32].

Os peixes foram coletados, anestesiados com 100 mg L⁻¹ de benzocaína e inoculados com 100 µL de *A. hydrophila*, aplicados por via intramuscular utilizando seringas de 1 mL. Após a inoculação, os peixes foram então transferidos para tanques de 80 L fornecidos com um sistema de aeração constante estático para aplicação de banhos terapêuticos.

Desenho experimental

Os tratamentos consistiram na aplicação de banhos terapêuticos (específicos para cada tratamento), que foram aplicados por 60 minutos e repetidos por 5 dias consecutivos. Os tratamentos foram: controle positivo (peixe inoculado com *A. hydrophila* e não tratado com OE), controle negativo (peixe inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 10 mg L⁻¹ de gentamicina), OE *L. sidoides* (2,5 e 5,0 mg L⁻¹), OE *O. gratissimum* (5,0 e 10,0 mg L⁻¹) e OE *Z. officinale* (5,0 e 10 mg L⁻¹), com 3 repetições em delineamento inteiramente casualizado. A mortalidade dos peixes foi avaliada a cada 24 h por 10 dias.

A qualidade da água foi monitorada durante os testes, apresentando temperatura de $30,25 \pm 1,92$ °C, oxigênio dissolvido de $7,01 \pm 0,66$ mg L⁻¹, pH de $7,01 \pm 0,21$, alcalinidade de $17,22 \pm 0,44$ mg L⁻¹ e teor de amônia total de $0,56 \pm 0,11$ mg L⁻¹.

Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos

Após os banhos terapêuticos, os peixes foram anestesiados com 100 mg L⁻¹ de benzocaína e seu sangue coletado por punção da veia caudal com seringas heparinizadas para determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Amostras de sangue foram utilizadas para determinar o hematócrito (Hct) pela centrifugação em tubos capilares (15.000 g por 10 min) e lidas em escala padronizada. A hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometemoglobina e a contagem de

eritrócitos (RBC) foi realizada em câmara de Neubauer, após diluição do sangue em solução de citrato de formol. O volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) foram determinados pelas equações fixas descritas por Ranzani-Paiva et al. [33]. Posteriormente, o sangue foi centrifugado para obtenção de plasma e utilizado para determinação da-glicose (PG), proteína total (PC), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) pelo método colorimétrico, utilizando kits comerciais (Labtest®, MG, Brasil).

Análise histopatológica

Após os banhos terapêuticos, aos 7, 14 e 21 dias, seis peixes foram coletados por tratamento para análise histopatológica. Para isso, os peixes foram anestesiados e eutanasiados por punção craniana [34] e o tecido hepático coletado e fixado em formaldeído tamponado a 10%. Depois disso, amostras de tecido hepático foram desidratadas em uma série graduada de etanol e impregnadas em parafina. As seções de 5 µm foram obtidas, e três lâminas de cada peixe foram preparadas e coradas com Hematoxilina-Eosina [35]. As análises e imagens microscópicas foram realizadas com microscópio ótico Leica, modelo DM 500. As imagens foram utilizadas para avaliação semiquantitativa do dano hepático e os seguintes eventos foram registrados para cada tratamento: estágio I (órgão não comprometido), estágio II (mais grave e prejudicar a função normal do órgão) e estágio III (muito grave e irreversível). Em seguida, foi calculado um valor de HAI (Índice de Alteração Histológica) para cada amostra, usando a fórmula $HAI = 100 \Sigma I + 101 \Sigma II + 102 \Sigma III$ sendo que I, II e III são os estágios classificatórios para alteração tecidual, e os valores obtidos foram interpretados de acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutundzic [36].

Análise estatística

Os resultados obtidos são expressos como média ± desvio padrão. A homogeneidade das variâncias dos dados foi testada pelo teste de Levene e a normalidade dos dados, avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados de resposta hematológica e bioquímica e sobrevivência (dados transformados) foram analisados por ANOVA one-way, seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para os dados histopatológicos, ANOVA

two-way seguida do teste de Holm-sidak ($h < 0,05$) foi aplicado para avaliar as diferenças nos valores do índice de alterações histológicas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

Neste estudo, 21, 18 e 27 componentes voláteis foram identificados no óleo essencial de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*, respectivamente (Tabela 1). Para a EO *L. sidoides*, o composto timol (76,6%) foi o principal, seguido do *p*-cimeno (6,3%) e do β -cariofileno (5,0%). Da mesma forma, Veras et al. [37] identificaram timol (84,9%) e *p*-cimeno (5,33%), e Cavalcanti et al. [38] identificaram timol (7,25-70,36%), carvacrol (0,30-46,09%), *p*-cimeno (8,36–15,06%) e β -cariofileno (0,19-8,81%) nas amostras de OE de *L. sidoides*. Para EO *O. gratissimum* foram identificados eugenol (43,3%) e 1,8-cineole (28,2%) neste estudo. Resultados semelhantes foram encontrados por Aguiar et al. [39], Silva et al. [23] e Bandeira Jr. et al. [24], porém as proporções de eugenol foram maiores (65,26%, 76,3%, 91,47%, respectivamente) do que os valores observados neste estudo. No OE de *Z. officinale* os compostos geranial (23,2%), neral (16,7%) e 1,8-cineole (15,8%) foram os principais compostos voláteis presentes no OE. Da mesma forma, Andrade et al. [40] relataram que os compostos encontrados no OE de *Z. officinale* foram geranial (25,06%), neral (16,47%) e 1,8-cineol (10,98%). Para os óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* foram descritas atividades antimicrobianas para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [14,25,26,41]. Segundo Marchese et al. [42], a atividade antimicrobiana destes óleos essenciais pode estar relacionada à sua composição química, que pode variar devido a fatores climáticos, genéticos, formas de coleta do material vegetal, dia e horário da colheita [22,43,44].

Após a aplicação dos banhos terapêuticos, os peixes do grupo controle positivo (peixes infectados e não tratados) tiveram 70,8% de sobrevivência. No grupo controle negativo (peixe infectado e tratado com gentamicina, 10 mg L⁻¹), a sobrevivência foi de aproximadamente 91,6%. Para OE de *O. gratissimum* (5,0 e 10 mg L⁻¹) a sobrevivência foi de 89,5 e 70,8%, com EO de *L. sidoides* (2,5 e 5,0 mg L⁻¹) sendo 68,7 e 75,0% e para OE de *Z. officinale* (5,0 e 10 mg L⁻¹) foi de 47,9 e 52,1% respectivamente. No entanto, os tratamentos com óleos essenciais não foram estatisticamente diferentes entre si e não diferiram dos grupos controle negativo e positivo, exceto para o grupo tratado com OE de *Z. officinale* (Figura 1). Sutili et al. [26] avaliando a atividade de *O. gratissimum* e *Hesperozygis ringens* em jundiá (*Rhamdia quelen*) experimentalmente infectados com *A. hydrophila* apresentaram 75-70% de sobrevivência, respectivamente, após seu uso em

banhos terapêuticos de 60 minutos por 5 dias consecutivos, corroborando os resultados evidenciados neste estudo com *O. gratissimum*. Isso porque o eugenol, presente em maiores proporções neste OE de *O. gratissimum*, possui natureza hidrofóbica, que permite penetrar no lipopolissacarídeo da membrana bacteriana Gram-negativa e alterar a estrutura celular, resultando em extravasamento de constituintes intracelulares, levando a diminuição na virulência de *A. hydrophila* [16,45,46].

Com o uso de *L. sidoides*, foram obtidos bons valores de sobrevivência de tambaquis inoculados com *A. hydrophila* (68,7 e 75,0%, com 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ OE), refletindo o papel dos compostos fenólicos na atividade antimicrobiana. Em outro estudo com tambaquis infectados experimentalmente com *A. hydrophila* obteve-se uma taxa de sobrevivência de 79,2%, próxima obtida neste estudo, com o uso de banho terapêutico com OE de *L. origanoides* (10 mg L⁻¹), que em sua composição têm constituintes similares aos de *L. sidoides*, mas em quantidades diferentes, carvacrol (49,7%), *p*-cimeno (13,3%) e timol (9,9%) [32]. Da mesma forma, Bandeira Junior et al. [47] obtiveram resultados semelhantes com uma taxa de sobrevivência de 58,33% com OE *L. origanoides* 5,0 µL L⁻¹, cujos principais compostos foram carvacrol (40,73%), *p*-cimeno (13,63%) e timol (8,19%). Da Cunha et al. [48] relataram que os jundiás submetidos aos banhos com o composto timol, principal composto de *L. sidoides* analisados neste estudo, apresentaram sobrevivência de 88,8% com 5, 10 e 15 mg L⁻¹ e 100% com 25 mg L⁻¹. Para o timol está relacionada a grande bioatividade nas bactérias Gram negativas, devido a sua maior afinidade pela estrutura lipídica da membrana circundante [49].

Dentre os óleos essenciais avaliados neste estudo, o OE de *Z. officinale* foi o menos eficaz, com os menores valores de sobrevivência (47,9 e 52,1%, com 5,0 e 10 mg L⁻¹ OE) de tambaquis após a inoculação de *A. hydrophila*. Em outro estudo, *O. niloticus* inoculado com *A. hydrophila* e alimentado com 2,5 g de dieta de gengibre kg⁻¹ apresentaram sobrevivência de 76,6% [50]. Segundo Sa-Nguenpuag et al. [51], a ação antibacteriana do óleo essencial de gengibre é mais efetiva contra bactérias Gram-positivas, corroborando os resultados de Brum et al. [52] que relataram 100% de sobrevivência de *O. niloticus* com 0,5% de gengibre na dieta quando inoculados com *Streptococcus agalactiae*. Neste estudo, o OE de *Z. officinale* apresentou em sua composição 39,9% de citral (presente na forma de estereoisômeros geranial e neral). O mecanismo antimicrobiano do citral é descrito pela alteração do pH intracelular, integridade e potencial da membrana e concentração de ATP intracelular [53].

Os parâmetros hematológicos são indicadores da eritropoiese e da capacidade de transporte de oxigênio em peixes, entre outros [54]. Neste estudo, tambaquis inoculados com *A. hydrophila* e expostos aos banhos terapêuticos com os OE de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* apresentaram diferença significativa nos valores de Hb, Hct, RBC, HCM e CHCM entre os tratamentos. No que se refere à Hb, peixes do tratamento com 2,5 mg L⁻¹ de OE *L. sidoides* apresentaram redução significativa em seus valores quando comparado aos peixes do tratamento de 5 mg L⁻¹ de OE *O. gratissimum*, contudo não houve diferença destes tratamentos em relação aos grupos controle (Tabela 2). Para os parâmetros Hct e RBC, os peixes dos tratamentos com OE de *L. sidoides* (2,5 e 5,0 mg L⁻¹) e de *Z. officinale* (5,0 e 10,0 mg L⁻¹) apresentaram os menores valores destes indicadores, comparados aos tratamentos com OE de *O. gratissimum* e com os controles (Tabela 2), bem como quando comparados aos valores basais de tambaqui [55], o que pode indicar a ocorrência de um processo anêmico, resultante da infecção pela bactéria *A. hydrophila*, e banhos com OE de *L. sidoides* e de *Z. officinale*.

As alterações no hematócrito observadas neste estudo também foram relatadas por Sutilli et al. [26] que observaram uma redução significativa nos valores de hematócrito de *R. quelen* tratados com os óleos de *Hesperozygis ringens* e *Ocimum americanum* (20 mg L⁻¹) em banhos de uma hora, por cinco dias consecutivos. Por outro lado, o aumento nos valores de Hb e Hct nos tratamentos com OE de *O. gratissimum* (5,0 e 10,0 mg L⁻¹) pode ser indicativo de uma melhora na capacidade de transporte de oxigênio nos peixes, conforme evidenciado por De Souza et al. [56] em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com OE de *Lippia alba* (2,0 ml kg dieta⁻¹).

Com relação às constantes corpusculares, os valores de HCM apresentaram-se elevados nos peixes pertencentes aos tratamentos com *L. sidoides* (5 mg L⁻¹), sendo estes valores significativamente diferente dos valores observados nos tratamentos com OE *O. gratissimum* (5 e 10 mg L⁻¹) e *Z. officinale* (10 mg L⁻¹), assim como dos grupos controle (positivo e negativo) e os valores de HCM do tratamento com OE de *Z. officinale* (5 mg L⁻¹) foram significativamente diferente do grupo tratado com OE de *O. gratissimum* (10 mg L⁻¹) e controle positivo. Para CHCM foi observado o mesmo padrão, sendo as diferenças observadas entre os tratamentos com OE de *L. sidoides* (5 mg L⁻¹) e os grupos tratados com OE de *O. gratissimum* (5 mg L⁻¹) e grupos controle (positivo e negativo); já o tratamento com *Z. officinale* (5 e 10 mg L⁻¹) os valores de CHCM foram significativamente maiores comparados aos do grupo controle negativo (Tabela 2). Entretanto, um padrão diferente para os valores de constantes corpusculares foram

relatados por Gabriel et al. [57] em *O. niloticus* desafiados com *Streptococcus iniae*, com aumento nos valores de HCM e CHCM de peixes suplementados com *Aloe vera* em comparação aos não suplementados.

Os níveis de glicose plasmática e proteínas totais de tambaquis infectados com *A. hydrophila* não foram afetados pela aplicação dos banhos terapêuticos com OE de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* (Tabela 2). Resultados similares foram relatados por Soares et al. [19] com o óleo de *L. sidoides* nas concentrações 10 e 20 mg L⁻¹ em 60 e 15 minutos de banho terapêutico para o tambaqui, respectivamente. O mesmo padrão também foi observado por Brum et al. [52] com a inclusão dos óleos essenciais de *O. gratissimum* e *Z. officinale* na dieta de *O. niloticus*. Portanto, estes resultados evidenciam que a aplicação de banhos com OE não promoveu uma condição de estresse agudo para o tambaqui, que comprometesse sua atividade metabólica. Com relação às aminotransferases (aspartato aminotransferase – AST e alanina aminotransferase - ALT), estas enzimas são utilizadas para o diagnóstico de certas alterações hepáticas que levam à destruição e necrose dos tecidos [58–60]. Neste estudo, os valores médios de ALT variaram de 47,4 a 63,9 U L⁻¹ e os valores de AST variaram de 45,6 a 68,5 U L⁻¹ (Tabela 2), e não houve diferença significativa entre os grupos tratados com óleo essencial e os grupos controle (positivo e negativo), ambos inoculados com *A. hydrophila*. Redução nos valores dessas aminotransferases (AST e ALT) no bagre africano (*Clarias gariepinus*) alimentado com dietas suplementadas com *Aloe vera* em relação ao controle, foram relatados por Gabriel et al. [60]. Este mesmo autor relata que a inclusão de *Aloe vera* na dieta de *O. niloticus* confere proteção contra danos no fígado causados por *Streptococcus iniae* [57]. Neste estudo não foi observado um efeito adicional dos tratamentos com óleo essencial em tambaquis infectados com *A. hydrophila*, portanto outras concentrações devem ser avaliadas visando maximizar essa atividade hepatoprotetora em peixes.

Com relação à análise das alterações teciduais associadas à aplicação de banhos terapêuticos com OE, poucos são os estudos conduzidos com peixes nativos como o tambaqui, pirarucu (*Arapaima gigas*) e jundiá (*Rhamdia quelen*), com predomínio de descrição qualitativa dos danos [17,19,61,62]. Entretanto, alterações histológicas degenerativas são comumente observadas em diferentes órgãos associados à infecção por *Aeromonas* sp. [63].

No presente estudo, a análise histopatológica do fígado de tambaquis infectados com *A. hydrophila* e expostos a banhos com OE de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*, indicou a maior frequência de danos leves (grau I) com ocorrência de

hipertrofia nuclear, hipertrofia/deformação celular, dilatação dos sinusóides e infiltração leucocitária, seguida de danos moderados (grau II) com picnose nuclear e degeneração/rompimento celular (Tabela 3). Infiltração leucocitária, dilatação dos sinusóides e picnose nuclear (Figura 2) também foram relatados por Brum et al. [64] em fígado de tilápia (*O. niloticus*), após o fornecimento de dietas contendo os óleos essenciais de *O. gratissimum* e *Z. officinale* e desafiados com *Streptococcus agalactiae*. Em ambos os estudos, não foi observado a ocorrência de fibrose ou necrose, danos severos e irreversíveis (grau III) (Tabela 3). Em contraste, danos potencialmente irreversíveis foram relatados em fígado de peixes infectados com *A. hydrophila* ou outras bactérias patogênicas [65–67].

Com relação aos valores do índice de alteração histológica (IAH), os menores valores deste índice foram observados nos peixes pertencentes ao tratamento com 2,5 mg L⁻¹ OE *L. sidoides* após 14 dias da aplicação dos banhos terapêuticos, os quais foram significativamente diferentes dos valores obtidos no tratamento com 10 mg L⁻¹ do OE *O. gratissimum* (Tabela 4). Similarmente, no tratamento com 10 mg L⁻¹ OE de *Z. officinale* foram registrados valores significativamente menores de IAH 21 dias após a aplicação dos tratamentos, comparados aos outros tratamentos com OE e também quando este foi comparado com os valores obtidos em 7 e 14 dias para o OE de *Zingiber officinale* (Tabela 4). É importante destacar que, após 21 dias, nos grupos controle positivo (peixes infectados com *A. hydrophila* e não tratados com OE) e negativo (peixe inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 10 mg L⁻¹ de gentamicina) os valores de IAH foram significativamente maiores (Tabela 4).

De acordo com a escala de classificação de dano de Poleksic and Mitrovic-Tutundzic [36], os valores médios de IAH situam-se entre 21 a 50, que indicam a ocorrência de danos moderados a severos no fígado e entre 51 a 100, valor associado à ocorrência de danos severos (Tabela 4). Estes resultados, de forma similar ao relatado em Mori et al. [68], sugerem que mesmo que os danos possam comprometer o funcionamento do órgão, a inoculação de *A. hydrophila* e os banhos com óleos essenciais não induzem alterações teciduais irreversíveis no tecido, como relatados em ensaios com quimioterápicos [69,70]. Portanto, no presente estudo, considerando a similaridade no grau de alteração tecidual e na frequência de ocorrência de danos, em todos os tratamentos com OE, a ocorrência de danos pode estar associada à infecção por *A. hydrophila*, pois o uso de óleos essenciais não induziu danos irreversíveis ao fígado, dados que corroboram os resultados das análises enzimáticas associadas ao órgão.

Os óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* apresentam atividade antimicrobiana *in vitro* frente diferentes cepas de *A. hydrophila* isoladas de tabaqui, com valores de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima variando de 625 a 5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [71]. Neste estudo, em ensaios *in vivo* utilizando o protocolo de banhos terapêuticos foi possível alcançar valores de sobrevivência de tabaquis infectados com *A. hydrophila* variando de 47,9 a 89,5% com o emprego destes óleos essenciais, sendo os melhores resultados obtidos com os OE de *O. gratissimum* e *L. sidoides*, respectivamente. Entretanto, as alterações hematológicas e histopatológicas observadas nestes tratamentos ocorreram em função da infecção por *A. hydrophila*. Diante desses resultados, vislumbra-se que novos estudos avaliando outras formas mais eficientes de tratamento como a inclusão destes OE na dieta, o uso de compostos bioativos dos OE de *O. gratissimum* e *L. sidoides*, bem como o uso de nanomoléculas destes OE possam contribuir para o estabelecimento de um protocolo terapêutico eficaz e seguro para o controle de doenças na criação de tabaquis, causadas por *A. hydrophila*.

Conclusão

Os óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *Lippia sidoides* em banhos de imersão apresentaram potencial para uso no tratamento de tabaqui infectado com *A. hydrophila*. Entretanto, o emprego de 5 mg L⁻¹ de *O. gratissimum* em protocolos de banhos terapêuticos permite alcançar melhor sobrevivência (89,5%) de tabaquis e menor alteração nos parâmetros hematológicos. As alterações histopatológicas observadas no fígado de tabaquis estão relacionadas à infecção por *A. hydrophila*.

Agradecimentos

À Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (MP2 02.12.01.020.00.00), CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (nº 485993 / 2013-9) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas - FAPEAM (#PPP 392/2012) pelo apoio financeiro. À Iraní Morais pelo auxílio nas análises de parâmetros fisiológicos. P. C. Monteiro e F. R. Brandão receberam bolsa de estudos de doutorado da FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas.

Referências

- [1] FAO - The State of World Fisheries and Aquaculture, FAO, Contrib. to Food Secur. Nutr. All. (2016) 200. <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>.
- [2] IBGE, Produção pecuária municipal 2016, Inst. Bras. Geografia e Estatística. 44 (2016) 1–51. doi:10.1016/j.dss.2003.08.004.
- [3] D.S.S. Valentim, J.L. Duarte, A.E.M.F.M. Oliveira, R.A.S. Cruz, J.C.T. Carvalho, E.C. Conceição, C.P. Fernandes, M. Tavares-Dias, Nanoemulsion from essential oil of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) shows *in vitro* efficacy against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalminidae), J. Fish Dis. 41 (2018) 443–449. doi:10.1111/jfd.12739.
- [4] G.M.R. Valladão, S.U. Gallani, F. Pilarski, South American fish for continental aquaculture, Rev. Aquac. 10 (2018) 351–369. doi:10.1111/raq.12164.
- [5] M. Tavares-Dias, M.L. Martins, An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms, J. Parasit. Dis. 41 (2017) 913–918. doi:10.1007/s12639-017-0938-y.
- [6] T.S. Alderman, D.J. Hastings, Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance - potential for consumer health risks, Int. J. Food Sci. Technol. 33 (1998) 139–155.
- [7] G.S.O. Hashimoto, F.M. Neto, M.L. Ruiz, M. Acchile, E.C. Chagas, F.C.M. Chaves, M.L. Martins, Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia, Aquaculture. 450 (2016) 182–186. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.07.029.
- [8] T. Gon Choudhury, V. Tharabenahalli Nagaraju, S. Gita, A. Paria, J. Parhi, Advances in Bacteriophage Research for Bacterial Disease Control in Aquaculture, Rev. Fish. Sci. Aquac. 25 (2017) 113–125. doi:10.1080/23308249.2016.1241977.
- [9] G.M.R. Valladão, S.U. Gallani, C. V. Ikefuti, C. da Cruz, N. Levy-Pereira, M.V.N. Rodrigues, F. Pilarski, Essential oils to control *ichthyophthiriasis* in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*, J. Fish Dis. 39 (2016) 1143–1152. doi:10.1111/jfd.12447.
- [10] D.S.C. Marques, D.A. Ferreira, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, J.M. Araújo, E.V.M. Maciel Carvalho, L.C.B.B. Coelho, Impact of stress on *Aeromonas* diversity in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and lectin level change towards a bacterial challenge, Environ. Technol. (United Kingdom). 37 (2016) 3030–3035. doi:10.1080/09593330.2016.1174313.

- [11] S. Gastalho, G.J. Silva, F. Ramos, Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana : Impacto em saúde pública Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance : Health care impact, *Acta Farm. Port.* 3 (2014) 29–45.
- [12] S.P. Carraschi, R. Barbuio, C.V. Ikefuti, T. Florêncio, C. da Cruz, M.J.T. Ranzani-Paiva, Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*, *Aquaculture.* 431 (2014) 124–128. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.12.026.
- [13] M. Reverter, N. Bontemps, D. Lecchini, B. Banaigs, P. Sasal, Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives, *Aquaculture.* 433 (2014) 50–61. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.05.048.
- [14] C. Majolo, F. Pilarski, F.C.M. Chaves, H.R. Bizzo, E.C. Chagas, Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil, *J. Essent. Oil Res.* 30 (2018) 388–397. doi:10.1080/10412905.2018.1487343.
- [15] M. Tavares-Dias, Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites, *Aquat. Living Resour.* 31 (2018) 13. doi:10.1051/alr/2018001.
- [16] J.A. da Cunha, B.M. Heinzmann, B. Baldisserotto, The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens – a review, *J. Appl. Microbiol.* 125 (2018) 328–344. doi:10.1111/jam.13911.
- [17] B.V. Soares, L.R. Neves, M.S.B. Oliveira, F.C.M. Chaves, M.K.R. Dias, E.C. Chagas, M. Tavares-Dias, Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects, *Aquaculture.* 452 (2016) 107–114. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.10.029.
- [18] R. Rawat, V. Tiwari, R. Singh, I.S. Bisht, Assessment of the Essential Oil Composition in *Ocimum* species of Uttarakhand, *J. Essent. Oil-Bearing Plants.* 20 (2017) 1331–1341. doi:10.1080/0972060X.2017.1383190.
- [19] B.V. Soares, L.R. Neves, D.O. Ferreira, M.S.B. Oliveira, F.C.M. Chaves, E.C. Chagas, R.A. Gonçalves, M. Tavares-Dias, Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae), *Vet. Parasitol.* 234 (2017) 49–56. doi:10.1016/j.vetpar.2016.12.012.

- [20] B.V. Soares, A.C.F. Cardoso, R.R. Campos, B.B. Gonçalves, G.G. Santos, F.C.M. Chaves, E.C. Chagas, M. Tavares-Dias, Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*, *Aquaculture*. 469 (2017) 72–78. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.12.001.
- [21] F.J.A. Lorenzi, H., Matos, Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas, Nova Odessa, Sp, 2000.
- [22] V.F. Fernandes, L.B. de Almeida, E.V.R.S. Feijó, D.C. Silva, R.A. de Oliveira, M.S. Mielke, L.C.B. Costa, Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*, *Brazilian J. Pharmacogn.* 23 (2013) 419–424. doi:10.1590/S0102-695X2013005000041.
- [23] L.L. Silva, Q.I. Garlet, G. Koakoski, T.A. Oliveira, L.J.G. Barcellos, B. Baldisserotto, A.M.S. Pereira, B.M. Heinzmann, Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress, *Rev. Bras. Plantas Med.* 17 (2015) 215–223. doi:10.1590/1983-084x/13_034.
- [24] G. Bandeira, T.S. Pês, E.M.H. Saccol, F.J. Sutili, W.R. Rossi, A.L. Murari, B.M. Heinzmann, M.A. Pavanato, A.C. de Vargas, L. de L. Silva, B. Baldisserotto, Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture, *Ind. Crops Prod.* 97 (2017) 484–491. doi:10.1016/j.indcrop.2016.12.040.
- [25] L.G. Matasyoh, J.C. Matasyoh, F.N. Wachira, M.G. Kinyua, A.W.T. Muigai, T.K. Mukiyama, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya, *African J. Bot.* 1 (2013) 50–054. www.internationalscholarsjournals.org.
- [26] F.J. Sutili, L. de Lima Silva, L.T. Gressler, L.T. Gressler, E.K. Battisti, B.M. Heinzmann, A.C. de Vargas, B. Baldisserotto, Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: *In vitro* activity and their use in experimentally infected fish, *J. Appl. Microbiol.* 119 (2015) 47–54. doi:10.1111/jam.12812.
- [27] M.K.N. Silva, V.R.A. Carvalho, E.F.F. Matias, Chemical Profile of Essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and Evaluation of Antibacterial and Drug Resistance-modifying Activity by Gaseous Contact Method, *Pharmacogn. J.* 8 (2015) 04–09. doi:10.5530/pj.2016.1.2.
- [28] C. Majolo, V.P. Nascimento, E.C. Chagas, F.C.M. Chaves, Antimicrobial activity of essential oil from *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* rhizomes against

- enteric Salmonella isolated from chicken | Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale*, Rev. Bras. Plantas Med. (2014) 505–512. doi:10.1590/1983-084X/13_109.
- [29] S. Munda, S. Dutta, S. Haldar, M. Lal, Chemical Analysis and Therapeutic Uses of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) Essential Oil: A Review, J. Essent. Oil-Bearing Plants. 21 (2018) 994–1002. doi:10.1080/0972060X.2018.1524794.
- [30] M.C.L. Potzernheim, H.R. Bizzo, J.P. Silva, R.F. Vieira, Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil, Biochem. Syst. Ecol. 42 (2012) 25–31. doi:10.1016/j.bse.2011.12.025.
- [31] A.W.W.A. and W.E.F. American Public Health Association, APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., Washington DC, 1998.
- [32] S.R.N. Oliveira, M.A.S. Oliveira, F.R. Brandão, C. Majolo, F.C.M. Chaves, E.C. Chagas, Toxicity of *Lippia origanoides* essential oil in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its effect against *Aeromonas hydrophila*, Bol. Inst. Pesca. 44 (2018) 1–7. doi:10.20950/1678-2305.2018.346.
- [33] M.J.T. Ranzani-Paiva, S.B. de Pádua, M. Tavares-Dias, M.I. Egami, Métodos para análise hematológica em peixes, EDUEM, 2013. doi:10.7476/9788576286530.
- [34] CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Dir. Da Prática Eutanásia Em Animais Incluídos Em Atividades Ensino Ou Pesqui. Científica. (2018) 1–49. https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf (accessed May 20, 2019).
- [35] J.D. Bancroft, M. Gamble, Theory and practice of histological techniques, 5th ed., 2002.
- [36] V. Poleksic V., Mitrovic-Tutundzic, Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish, in: Fish Gills as a Monit. Sublethal Chronic Eff. Pollut., 1994: pp. 339–352. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000092&pid=S1516-8913200800010002300014&lng=pt.
- [37] H.N.H. Veras, M.K.A. Araruna, J.G.M. Costa, H.D.M. Coutinho, M.R. Kerntopf,

- M.A. Botelho, I.R.A. Menezes, Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* cham: Possible mechanism of action, *Phyther. Res.* 27 (2013) 179–185. doi:10.1002/ptr.4695.
- [38] S.C.H. Cavalcanti, E. dos S. Niculau, A.F. Blank, C.A.G. Câmara, I.N. Araújo, P.B. Alves, Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch), *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 829–832. doi:10.1016/j.biortech.2009.08.053.
- [39] J.J.S. Aguiar, C.P.B. Sousa, M.K.A. Araruna, M.K.N. Silva, A.C. Portelo, J.C. Lopes, V.R.A. Carvalho, F.G. Figueredo, V.C.N. Bitu, H.D.M. Coutinho, T.A.S. Miranda, E.F.F. Matias, Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L., *Eur. J. Integr. Med.* 7 (2015) 151–156. doi:10.1016/j.eujim.2014.10.005.
- [40] M.A. Andrade, M. Das Graças Cardoso, L.R. Batista, A.C.T. Mallet, S.M.F. Machado, Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: Composition, antioxidant and antibacterial activities, *Rev. Cienc. Agron.* 43 (2012) 399–408. doi:10.1590/S1806-66902012000200025.
- [41] M.A. Botelho, N.A.P. Nogueira, G.M. Bastos, S.G.C. Fonseca, T.L.G. Lemos, F.J.A. Matos, D. Montenegro, J. Heukelbach, V.S. Rao, G.A.C. Brito, Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 40 (2007) 349–356. doi:10.1590/S0100-879X2007000300010.
- [42] A. Marchese, R. Barbieri, E. Coppo, I.E. Orhan, M. Daglia, S.F. Nabavi, M. Izadi, M. Abdollahi, S.M. Nabavi, M. Ajami, Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint, *Crit. Rev. Microbiol.* 43 (2017) 668–689. doi:10.1080/1040841X.2017.1295225.
- [43] H. Mith, E. Yayi-Ladékan, S.D.S. Kpoviessi, I.Y. Bokossa, M. Moudachirou, G. Daube, A. Clinquart, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Ocimum basilicum*, *Ocimum canum* and *Ocimum gratissimum* in Function of Harvesting Time, *J. Essent. Oil-Bearing Plants.* 19 (2016) 1413–1425. doi:10.1080/0972060X.2014.890076.
- [44] G.R. Smitha, V. Tripathy, Seasonal variation in the essential oils extracted from leaves and inflorescence of different *Ocimum* species grown in Western plains of India, *Ind. Crops Prod.* 94 (2016) 52–64. doi:10.1016/j.indcrop.2016.07.041.
- [45] S. Burt, Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in

- foods - A review, *Int. J. Food Microbiol.* 94 (2004) 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- [46] F.J. Sutili, L.C. Kreutz, M. Noro, L.T. Gressler, B.M. Heinzmann, A.C. de Vargas, B. Baldisserotto, The use of eugenol against *Aeromonas hydrophila* and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*), *Vet. Immunol. Immunopathol.* 157 (2014) 142–148. doi:10.1016/j.vetimm.2013.11.009.
- [47] G. Bandeira Junior, C.F. Souza, M.D. Baldissera, S.N. Descovi, B.P. Silveira, C. Tasca, R.H.V. Mourão, A.P.C. Vargas, B. Baldisserotto, Plant essential oils against bacteria isolated from fish: an *in vitro* screening and *in vivo* efficacy of *Lippia origanoides*, *Ciência Rural.* 49 (2019). doi:10.1590/0103-8478cr20190064.
- [48] J.A. da Cunha, G. Bandeira Junior, E.G. da Silva, C. de Ávila Scheeren, V.P. Fausto, J. Salbego, R. de Almeida Vaucher, A.C. de Vargas, B. Baldisserotto, The survival and hepatic and muscle glucose and lactate levels of *Rhamdia quelen* inoculated with *Aeromonas hydrophila* and treated with terpinen-4-ol, carvacrol or thymol, *Microb. Pathog.* 127 (2019) 220–224. doi:10.1016/j.micpath.2018.12.005.
- [49] F. Sharififar, M.H. Moshafi, S.H. Mansouri, M. Khodashenas, M. Khoshnoodi, In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss, *Food Control.* 18 (2007) 800–805. doi:10.1016/j.foodcont.2006.04.002.
- [50] C.N. Payung, R.A. Tumbol, H. Manoppo, Dietary ginger (*Zingiber officinale*) enhance resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas hydrophila*, *AAFL Bioflux.* 10 (2017) 962–968.
- [51] K. Sa-Nguanpuag, S. Kanlayanarat, V. Srilaong, K. Tanprasert, C. Techavuthiporn, Ginger (*Zingiber officinale*) oil as an antimicrobial agent for minimally processed produce: A case study in shredded green papaya, *Int. J. Agric. Biol.* 13 (2011) 895–901.
- [52] A. Brum, S.A. Pereira, M.S. Owatari, E.C. Chagas, F.C.M. Chaves, J.L.P. Mouriño, M.L. Martins, Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*, *Aquaculture.* 468 (2017) 235–243. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.10.020.
- [53] C. Shi, K. Song, X. Zhang, Y. Sun, Y. Sui, Y. Chen, Z. Jia, H. Sun, Z. Sun, X.X. Xia, Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against

- Cronobacter sakazakii*, PLoS One. 11 (2016) 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0159006.
- [54] A.H. Houston, Review: Are the Classical Hematological Variables Acceptable Indicators of Fish Health?, Trans. Am. Fish. Soc. 126 (2004) 879–894. doi:10.1577/1548-8659(1997)126<0879:ratchv>2.3.co;2.
- [55] M. Tavares-Dias, Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados, Aquicultura No Bras. Novas Perspect. Para a Produção. 1 (2015) 11–30.
- [56] R.C. de Souza, E.M. de Souza, M.M. da Costa, J.F.B. Melo, B. Baldisserotto, C.E. Copatti, Dietary addition of the essential oil from *Lippia alba* to Nile tilapia and its effect after inoculation with *Aeromonas* spp., Aquac. Nutr. 25 (2019) 39–45. doi:10.1111/anu.12827.
- [57] N.N. Gabriel, J. Qiang, X.Y. Ma, J. He, P. Xu, K. Liu, Dietary *Aloe vera* improves plasma lipid profile, antioxidant, and hepatoprotective enzyme activities in GIFT-tilapia (*Oreochromis niloticus*) after *Streptococcus iniae* challenge, Fish Physiol. Biochem. 41 (2015) 1321–1332. doi:10.1007/s10695-015-0088-z.
- [58] N.A. Al-Asgah, A.W.A. Abdel-Warith, E.S.M. Younis, H.Y. Allam, Haematological and biochemical parameters and tissue accumulations of cadmium in *Oreochromis niloticus* exposed to various concentrations of cadmium chloride, Saudi J. Biol. Sci. 22 (2015) 543–550. doi:10.1016/j.sjbs.2015.01.002.
- [59] V. Zadmajid, C. Mohammadi, Dietary thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) changes serum stress markers, enzyme activity, and hematological parameters in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to silver nanoparticles, علوم مجله ایران شیلانی. 16 (2017) 1063–1084. <http://jifro.ir/article-1-2875-fa.html> (accessed July 30, 2019).
- [60] N.N. Gabriel, M.R. Wilhelm, H.M. Habte-Tsion, P. Chimwamurombe, E. Omoregie, L.N. Iiping, K. Shimooshili, Effect of dietary *Aloe vera* polysaccharides supplementation on growth performance, feed utilization, hemato-biochemical parameters, and survival at low pH in African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings, Int. Aquat. Res. 11 (2019) 57–72. doi:10.1007/s40071-019-0219-8.
- [61] D.F. Malheiros, P.O. Maciel, M.N. Videira, M. Tavares-Dias, Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea), Aquaculture. 455 (2016) 81–86.

- doi:10.1016/j.aquaculture.2016.01.018.
- [62] D.B.N. Spanghero, E.C.A. de M. Spanghero, J. dos S. Pedron, E.C. Chagas, F.C.M. Chaves, E. Zaniboni-Filho, Peppermint essential oil as an anesthetic for and toxicity to juvenile silver catfish, *Pesqui. Agropecuária Bras.* 54 (2019). doi:10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.00367.
- [63] H.T. Dong, C. Techatanakitarnan, P. Jindakittikul, A. Thaiprayoon, S. Taengphu, W. Charoensapsri, P. Khunrae, T. Rattanarojpong, S. Senapin, *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), *J. Fish Dis.* 40 (2017) 1395–1403. doi:10.1111/jfd.12617.
- [64] A. Brum, L. Cardoso, E.C. Chagas, F.C.M. Chaves, J.L.P. Mourião, M.L. Martins, Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*, *Aquaculture.* 490 (2018) 98–107. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.02.040.
- [65] K.M. Alagappan, B. Deivasigamani, S. Kumaran, M. Sakthivel, Histopathological Alterations in Estuarine Catfish (*Arius maculatus*; Thunberg, 1792) Due to *Aeromonas hydrophila* Infection, 1 (2009) 185–189.
- [66] J.H. Yu, J.J. Han, K.S. Park, K.H. Park, S.W. Park, *Edwardsiella tarda* infection in Korean catfish, *Silurus asotus*, in a Korean fish farm, *Aquac. Res.* 41 (2009) 19–26. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02296.x.
- [67] A.H.M.H. and A.S.H. A.E. Noor El Deen, Sohad, M. Dorgham, Studies on *Aeromonas hydrophila* in Cultured *Oreochromis niloticus* at Kafr El Sheikh Governorate, Egypt with Reference to Histopathological Alterations in Some Vital Organs, *World J. Fish Mar. Sci.* 6 (2014) 233–240. doi:10.5829/idosi.wjfm.2014.06.03.83136.
- [68] N.N. Mori, B.T. Michelotti, T.S. Pês, C.A. Bressan, F. Sutili, L.C. Kreutz, Q. Garlet, B. Baldisserotto, M.A. Pavanato, V.R. Cerqueira, S.T. Costa, B.M. Heinzmann, Citral as a dietary additive for *Centropomus undecimalis* juveniles: Redox, immune innate profiles, liver enzymes and histopathology, *Aquaculture* 501 (2018) 14-21. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.003.
- [69] B. Velmurugan, T. Mathews, E.I. Cengiz, Histopathological effects of cypermethrin on gill, liver and kidney of fresh water fish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), and recovery after exposure, *Environ. Technol.* 30 (2009) 1453–1460. doi:10.1080/09593330903207194.
- [70] B.B. Sarkar, A. Chatterjee, S. Adhikari, S. Ayyappan, Carbofuran- and

cypermethrin-induced histopathological alterations in the liver of *Labeo rohita* (Hamilton) and its recovery, 21 (2005) 131–135.

- [71] P.C. Monteiro, Potencial antibacteriano dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* em juvenis de *Colossoma macropomum* infectados por *Aeromonas hydrophila*, Universidade Federal do Amazonas, 2019.

Fíguas e Tabelas

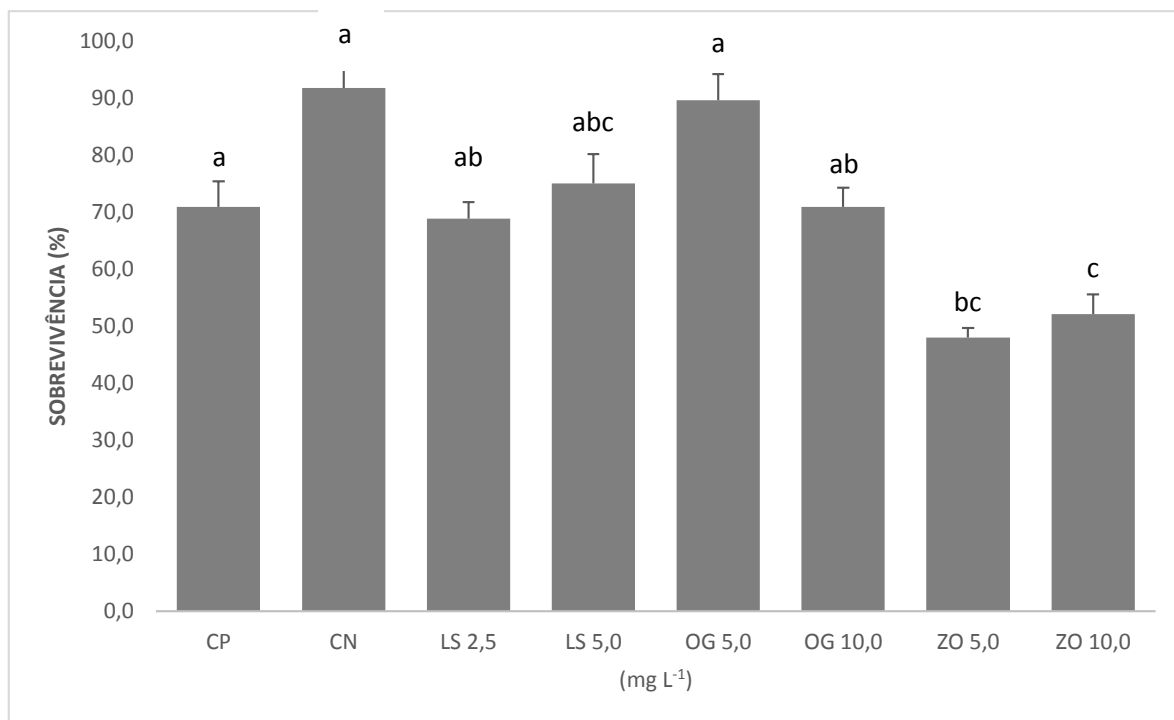


Figura 1. Taxa de sobrevivência de tambaquis (*C. macropomum*) infectado com *A. hydrophila* e submetidos a banhos terapêuticos com óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos determinados por ANOVA one-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). CP= Controle Positivo (peixe inoculado com *A. hydrophila* e não tratado com óleo essencial); CN= Controle Negativo (peixe inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 10 mg L⁻¹ de gentamicina); LS= *Lippia sidoides*; OG= *Ocimum gratissimum*; ZO= *Zingiber officinale*.

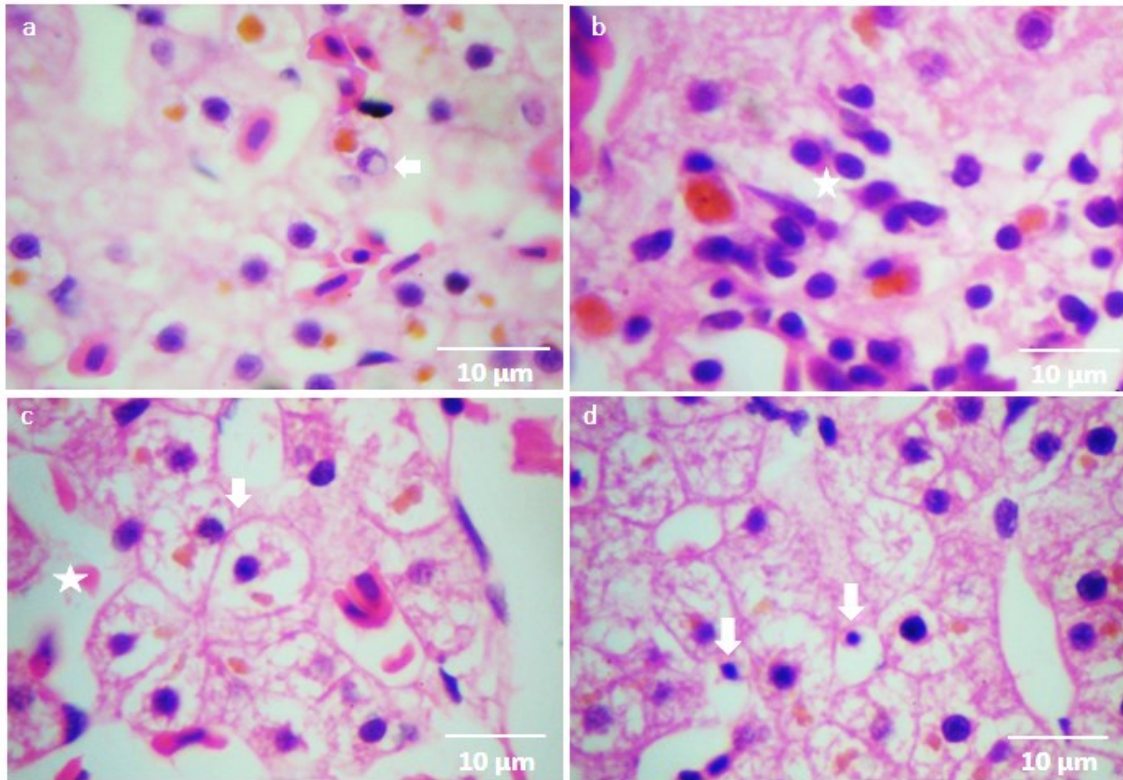


Figura 2. Alterações hepáticas leves e moderadas registradas em *C. macropomum* infectados com *A. hydrophila*, após banhos com óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*. a. hepatócito com núcleo picnótico (seta); b. infiltração leucocitária (estrela); c. hipertrofia celular (seta) e dilatação do capilar sinusóide (asteriscus); d. hepatócitos com núcleos picnóticos em posição marginal.

Tabela 1. Composição química (%) dos óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*.

	Components	<i>L.</i> <i>sidoides</i>	<i>O.</i> <i>gratissimum</i>	<i>Z.</i> <i>officinale</i>	LRI_{lit}	LRI_{exp}
1	2-heptanone	-	-	1.0	889	890
2	tricyclene	-	-	0.3	921	922
3	α -thujene	0.3	-	-	924	929
4	α -pinene	0.1	-	2.9	932	932
5	camphene	-	-	11.3	946	947
7	sabinene	-	0.7	-	969	975
8	β -pinene	-	2.8	0.6	974	976
9	6-methyl-5-hepten-2-one	-	-	1.2	981	985
10	myrcene	1.1	0.7	1.8	988	988
11	α -phellandrene	-	-	0.3	1002	1005
12	α -terpinene	0.7	-	-	1014	1019
13	<i>p</i> -cymene	6.3	-	-	1020	1022
14	limonene	0.4	-	-	1024	1025
15	β -phellandrene	-	-	4.0	1025	1028
16	1,8-cineole	0.7	28.2	15.8	1026	1030
17	(<i>Z</i>)-ocimene	-	3.7	-	1032	1038
19	γ -terpinene	2.0	-	-	1054	1061
21	terpinolene	-	-	0.3	1086	1088
24	linalool	-	1.3	1.8	1095	1100
25	ipsdienol	0.6	-	-	1140	1148
26	camphor	-	-	0.4	1141	1142
28	citronellal	-	-	0.3	1148	1152
32	δ -terpineol	-	0.4	-	1162	1166
33	borneol	-	-	4.3	1165	1164
35	umbelulone	0.2	-	-	1167	1176
36	terpinen-4-ol	1.0	0.4	0.6	1174	1178
37	(<i>E</i>)-isocitral	-	-	0.5	1177	1182
39	α -terpineol	0.2	1.1	2.8	1186	1190
40	myrtenal	-	-	0.5	1195	1190
43	citronellol	-	-	1.0	1223	1228
45	thymol methyl ether	1.0	-	-	1232	1236
47	neral	-	-	16.7	1235	1242
49	geraniol	-	-	1.9	1249	1254
50	geranial	-	-	23.2	1264	1272
53	thymol	76.6	-	-	1289	1296
56	eugenol	-	43.3	-	1357	1357
58	α -copaene	0.4	-	-	1374	1375
59	β -bourbonene	-	0.9	-	1387	1381
60	β -elemene	-	0.8	-	1389	1389
61	(<i>E</i>)-caryophyllene	-	3.7	-	1417	1415

62	β -caryophyllene	5.0	-	-		1417
64	aromadendrene	0.4	-	-	1439	1436
65	α -humulene	0.3	0.6	-	1452	1450
67	γ -muurolene	-	0.9	-	1478	1477
68	<i>ar</i> -curcumene	-	-	1.0	1479	1481
69	β -selinene	-	5.5	-	1489	1482
70	ledene	0.3	-	-		1492
71	α -zingiberene	-	-	2.1	1493	1494
72	α -selinene	-	1.7	-	1498	1496
75	(<i>E,E</i>)- α -farnesene	-	-	1.2	1505	1508
77	7- <i>epi</i> - α -selinene	-	0.4	-	1520	1513
78	β -sesquiphellandrene	-	-	1.1	1521	1522
79	δ -cadinene	0.3	-	-	1522	1521
80	caryophyllene oxide	0.7	-	-	1582	1572
Total identified		98.6	97.1	98.9		

Tabela 2. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaquis infectados com *A. hydrophila* e submetidos a banhos terapêuticos com de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*.

Parâmetros	CP	CN	<i>L. sidoides</i>		<i>O. gratissimum</i>		<i>Z. officinale</i>	
			2,5 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹
Hb (g dL ⁻¹)	8,10 ± 1,95 ab	7,86 ± 1,93 ab	5,82 ± 1,76 b	7,48 ± 2,52 ab	8,65 ± 1,03 a	8,12 ± 1,78 ab	6,34 ± 1,09 ab	6,21 ± 0,85 ab
Hct (%)	37,33 ± 8,00 a	39,89 ± 5,21 a	21,71 ± 5,72 b	24,13 ± 5,62 b	40,56 ± 3,97 a	35,67 ± 8,89 a	22,67 ± 3,08 b	22,33 ± 2,92 b
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	2,06 ± 0,51 a	1,97 ± 0,48 a	1,35 ± 0,41 b	1,13 ± 0,50 b	2,05 ± 0,34 a	2,24 ± 0,45 a	1,12 ± 0,17 b	1,19 ± 0,15 b
VCM (µm ³)	188,52 ± 51,55 a	208,97 ± 36,20 a	174,64 ± 71,72 a	243,94 ± 72,63 a	202,17 ± 39,02 a	164,85 ± 51,08 a	206,07 ± 38,73 a	190,00 ± 30,91 a
HCM (pg)	39,44 ± 2,55 a	39,99 ± 4,34 ab	45,93 ± 18,00 ab	74,19 ± 21,33 c	43,27 ± 10,00 ab	36,30 ± 3,80 a	57,24 ± 9,64 bc	52,95 ± 9,73 ab
CHCM (%)	21,90 ± 4,14 ab	19,66 ± 3,95 b	26,76 ± 3,14 abc	30,72 ± 5,29 c	21,48 ± 2,99 ab	23,86 ± 8,16 abc	28,13 ± 4,70 ac	27,87 ± 2,30 ac
GP (mg dL ⁻¹)	68,68 ± 25,76 a	83,00 ± 37,29 a	67,15 ± 24,67 a	69,99 ± 34,51 a	69,76 ± 24,76 a	65,47 ± 32,33 a	66,96 ± 24,36 a	69,80 ± 27,43 a
PT (g dL ⁻¹)	2,07 ± 0,71 a	2,11 ± 0,55 a	2,25 ± 0,57 a	2,22 ± 0,48 a	2,47 ± 0,53 a	2,14 ± 0,56 a	2,26 ± 0,66 a	2,34 ± 0,68 a
ALT (U L ⁻¹)	56,7 ± 40,4 a	47,4 ± 39,7 a	56,7 ± 41,2 a	63,9 ± 52,8 a	52,2 ± 45,5 a	56,82 ± 38,9 a	50,1 ± 30,9 a	53,9 ± 41,9 a
AST (U L ⁻¹)	68,5 ± 36,3 a	57,8 ± 25,4 a	55,1 ± 17,5 a	55,4 ± 23,2 a	45,6 ± 10,2 a	57,6 ± 35,3 a	58,0 ± 32,5 a	61,4 ± 17,9 a

Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (Teste de Tukey, p<0,05). CP= Controle Positivo (peixe inoculado com *A. hydrophila* e não tratado com óleo essencial); CN= Controle Negativo (peixe inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 10 mg L⁻¹ de gentamicina). Hb = Hemoglobina; Ht = Hematócrito; RBC = Número de eritrócitos; VCM = Volme Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina

Corpuscular Média; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, GP = glicose plasmática, PT = proteínas totais, ALT = alanina aminotransferase, AST = aspartato aminotransferase.

Tabela 3. Frequência de ocorrência (%) de danos em fígado de *C. macropomum* infectado por *A. hydrophila*, após banhos terapêuticos com óleo essencial de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*.

Estágio de dano	Alteração tecidual	Dias	CP	CN	<i>L. sidoides</i>		<i>O. gratissimum</i>		<i>Z. officinale</i>	
					2,5 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	5mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹
I	Hipertrofia nuclear / celular; dilatação sinusoidal; deformação do contorno celular; Infiltração de leucócitos	7	58,1	59,67	62,5	52,3	60,5	54,4	59,2	56,5
		14	54,8	61,14	55,3	60	58,3	58,3	55,2	57,2
		21	57,1	54,78	57,1	58,3	56,7	57,2	58,3	63,3
II	Degeneração dos núcleos / citoplasma; núcleos picnóticos; ruptura celular	7	41,9	40,33	37,5	47,7	39,5	45,6	40,8	43,5
		14	45,2	38,86	44,7	40	41,7	41,7	44,8	42,8
		21	42,9	45,21	42,9	41,7	43,3	42,8	41,7	36,7
III	Necrose focal / fibrose	7	0	0	0	0	0	0	0	0
		14	0	0	0	0	0	0	0	0
		21	0	0	0	0	0	0	0	0

Controle Positivo = peixe inoculado com *A. hydrophila* e não tratado com óleo essencial; Controle Negativo = peixe inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 10 mg L⁻¹ de gentamicina.

Tabela 4. Valores médios \pm erro padrão do Índice de alteração histopatológica (IAH) em fígado de *C. macropomum* infectado por *A. hydrophila*, após banhos terapêuticos com óleo essencial de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*.

Tratamentos	Tempo (dias)		
	7	14	21
Controle positivo	57,0 \pm 3,6aA	53,8 \pm 5,0abA	62,2 \pm 2,0aA
Controle negativo	54,8 \pm 1,6aA	56,2 \pm 3,8abA	62,2 \pm 2,2aA
LS 2,5 mg L ⁻¹	52,5 \pm 2,0aA	47,2 \pm 2,0aA	56,7 \pm 0,2aA
LS 5,0 mg L ⁻¹	59,2 \pm 2,5aA	50,6 \pm 3,0abA	56,7 \pm 0,2aA
OG 5,0 mg L ⁻¹	57,7 \pm 2,6aA	58,7 \pm 1,7abA	60,3 \pm 2,1aA
OG 10,0 mg L ⁻¹	57,8 \pm 3,8aA	60,3 \pm 2,1bA	56,7 \pm 4,3aA
ZO 5,0 mg L ⁻¹	57,0 \pm 0,4aA	58,4 \pm 3,6abA	54,8 \pm 5,0abA
ZO 10,0 mg L ⁻¹	56,4 \pm 0,2aA	56,7 \pm 0,2abA	43,0 \pm 2,2bB

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Letras maiúsculas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempos observados.

CAPÍTULO III

Óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* incorporados à dieta de *Colossoma macropomum*: crescimento, parâmetros hemato-imunológicos e resistência frente *Aeromonas hydrophila*.

Patrícia Castro Monteiro^a; Franmir Rodrigues Brandão^a; Caio Francisco Santana Farias^b; Cláudia Majolo^c; Jony Koji Dairiki^c; Marcelo Róseo de Oliveira^c; Francisco Célio Maia Chaves^c; Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan^{a,c} Edsandra Campos Chagas^{a,c}

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, 69067-005, Manaus, AM, Brazil

^bUninorte Laureate International Universities, Av. Joaquim Nabuco 1469, Centro, 69020-030, Manaus, AM, Brazil

^cEmbrapa Amazônia Ocidental, AM-010, Km 29, Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM, Brazil

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão de óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* na dieta de tambaqui (*Colossoma macropomum*) sobre os parâmetros de crescimento, hematológicos e imunológicos, bem como sua resistência frente à infecção induzida por *Aeromonas hydrophila*. Sete dietas foram elaboradas contendo 32% de proteína bruta e duas concentrações de cada óleo essencial, compondo os seguintes tratamentos: 1) 0 g kg⁻¹ (controle); 2) 0,625 g kg⁻¹ e 3) 1,25 g kg⁻¹ do óleo essencial de *L. sidoides*; 4) 1,25 g kg⁻¹ e 5) 5,0 g kg⁻¹ de óleo essencial de *O. gratissimum*; 6) 1,25 g kg⁻¹ e 7) 5,0 g kg⁻¹ de óleo essencial de *Z. officinale*, com três repetições. Ao final de 30 e 60 dias de alimentação, os parâmetros de desempenho e algumas variáveis hematológicas foram avaliadas e não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05), sendo observado somente redução de trombócitos totais ao final de 30 dias de alimentação com 1,25 g kg⁻¹ e 5,0 g kg⁻¹ de óleo essencial de *O. gratissimum*. Após o período de 60 dias, os juvenis de tambaqui foram desafiados com a bactéria *A. hydrophila* (1,6 x 10⁸ UFC mL⁻¹), sendo observados por 10

dias. A adição de $0,625 \text{ g kg}^{-1}$ e $1,25 \text{ g kg}^{-1}$ de óleo essencial de *L. sidoides* na dieta de tambaquis promoveu respostas de imunidade inespecífica através do aumento da atividade respiratória de leucócitos, após infecção induzida, com redução nos níveis de glicose plasmática, que sugere ação de insulina, e sem alteração nos níveis de proteínas totais. A sobrevivência de peixes infectados com *A. hydrophila* foi maior naqueles alimentados com $0,625 \text{ g kg}^{-1}$ de óleo essencial de *L. sidoides*.

Palavras-chave: Suplementação dietética, antibacteriano, parâmetros fisiológicos, tambaqui

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of the inclusion of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* essential oils in tambaqui (*Colossoma macropomum*) diet on growth, hematological and immunological parameters, as well as their resistance to *Aeromonas hydrophila*-induced infection. Seven diets were prepared containing 32% crude protein and two concentrations of each essential oil, composing the following treatments: 1) 0 g kg⁻¹ (control); 2) 0.625 g kg⁻¹ and 3) 1.25 g kg⁻¹ of *L. sidoides* essential oil; 4) 1.25 g kg⁻¹ and 5) 5.0 g kg⁻¹ of *O. gratissimum* essential oil; 6) 1.25 g kg⁻¹ and 7) 5.0 g kg⁻¹ of *Z. officinale* essential oil, with three repetitions. At the end of 30 and 60 days of feeding, the performance parameters and some hematological variables were evaluated and showed no significant differences between treatments ($p < 0.05$), with only a reduction in total thrombocytes after 30 days of feeding with 1.25 g kg⁻¹ and 5.0 g kg⁻¹ of *O. gratissimum* essential oil. After 60 days, tambaqui juveniles were challenged with the bacteria *A. hydrophila* (1.6×10^8 CFU mL⁻¹) and observed for 10 days. The addition of 0.625 g kg⁻¹ and 1.25 g kg⁻¹ of *L. sidoides* essential oil in tambaqui diet promoted nonspecific immunity responses through increased leukocyte respiratory activity after induced infection, with reduction in levels of plasma glucose, which suggests insulin action, and no change in total protein levels. The survival of *A. hydrophila*-infected fish was higher in those fed with 0.625 g kg⁻¹ of *L. sidoides* essential oil.

Keyword: Essential oil, dietary supplementation, antibacterial, physiological parameters

1. Introdução

Dentre os setores da aquicultura, a produção mundial de peixes tem aumentado progressivamente nos últimos anos, principalmente para algumas espécies de peixes de água salgada e doce, tais como carpa-do-limo (*Ctenopharyngodon idellus*), carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), carpa-comum (*Cyprinus carpio*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (FAO, 2018). No Brasil, o tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) é a segunda espécie de peixe mais cultivada, apresentando uma expressiva produção de 88,5 mil toneladas em 2017, representando 18,2% da produção nacional (IBGE, 2017). Esta espécie nativa tem grande aceitação pelo mercado consumidor do país, em especial nas regiões norte e nordeste (Valladão et al., 2018).

Na criação intensiva dos peixes, com emprego de elevada densidade de estocagem entre outros fatores, estes organismos se tornam vulneráveis e susceptíveis a perdas ocasionadas por doenças (Kreutz et al., 2016). No Brasil, as perdas por doenças bacterianas e parasitárias na piscicultura são estimadas em 84 milhões de dólares, com custos diretos e indiretos (Tavares-Dias e Martins, 2017). As doenças de origem bacteriana, como a septicemia hemorrágica causada por *Aeromonas hydrophila* são consideradas de alta virulência em peixes teleósteos (Sebastião et al., 2018; Figueiredo e Leal, 2008; Moraes e Martins, 2004).

Nos últimos anos o uso de produtos derivados de plantas tem se mostrado promissor ao setor aquícola, como alternativa para o tratamento de doenças bacterianas, uma vez comprovado o desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos convencionais (dos Santos et al., 2017; Valladão et al., 2015). Neste sentido, mais de 60 diferentes espécies de plantas medicinais têm sido estudadas para melhorar a saúde dos peixes e o manejo de doenças na aquicultura (Bulfon et al., 2015). Entre as espécies está *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae), planta nativa do nordeste brasileiro, popularmente conhecida como alecrim-pimenta. Tem mostrado valiosas propriedades biológicas e tem sido considerada como fonte potencial de compostos biologicamente ativos (Tavares-Dias, 2018; Lorenzi e Matos, 2000). Os produtos derivados das folhas de *L. sidoides* mostram importância na indústria principalmente por suas características calmante, anti-inflamatória (Mattos et al., 2007), antimicrobiana (Majolo et al., 2018; Vázquez-Sánchez et al., 2018), antifúngica (Brito et al., 2015), antihelmíntica (Souza et al., 2010; Camurça-Vasconcelos et al., 2007), acaricida (Cavalcanti et al., 2010), anestésica (Ventura et al., 2019).

Ocimum gratissimum L. (Lamiaceae), originária do continente asiático e subespontânea em todo Brasil, sendo encontrada principalmente na região Nordeste (Brasil, 2015) e conhecida popularmente como alfavaca, alfavacão, manjerição e alfavaca-cravo. Suas folhas apresentam propriedades medicinais, com excelente atividade antimicrobiana (Aguiar et al., 2015; Alo et al., 2012), anestésica (Boijink et al., 2016; Benovit et al., 2012), inseticida (Benelli et al., 2019; Gomes e Favero, 2011), repelente (Araújo et al., 2019), antifúngica (De Castro et al., 2019), imunoestimulante, conferindo resistência às doenças, e como promotora de crescimento em tilápia do Nilo (Brum et al., 2017).

Zingiber officinale R. (Zingiberaceae) é uma espécie originária da Índia e da China que se difundiu nas regiões tropicais do mundo (Mattos et al., 2007), sendo conhecida popularmente como gengibre e ao norte do Brasil como mangarataia. Amplamente comercializada na fabricação de alimentos, bebidas, perfumes (Elpo e Negrelle, 2004) e de grande importância na indústria farmacêutica, exercendo excelente atividade como antibacteriano (Hossain et al., 2019; Snuossi et al., 2016), antioxidante (Andreo e Jorge, 2011) e imunoestimulante, apresentando significativos resultados na resistência dos peixes a infecções bacterianas (Fadefard et al., 2018; Brum et al., 2017). Além disso, estas três espécies de plantas medicinais fazem parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Brasil, 2009), devido ao potencial terapêutico presente em sua composição.

Estudos mostram que o uso de óleos essenciais como aditivos alimentares é considerado alternativa favorável por exercer efeitos terapêuticos e profiláticos, além de mostrar benefícios no ganho de peso e no sistema imunológico (Abdel Rahman et al., 2019; Haghghi e Rohani, 2013; Harikrishnan et al., 2011). Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da inclusão de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* na dieta de tambaqui (*C. macropomum*) sobre os parâmetros de crescimento, hematológicos e imunológicos, bem como sua resistência frente a infecção induzida por *A. hydrophila*.

2. Material e métodos

2.1. Coleta dos peixes

Juvenis de tambaqui ($14,02 \pm 1,00$ g e $9,45 \pm 0,90$ cm) foram adquiridos de uma piscicultura comercial (Rio Preto da Eva, AM, Brasil) e aclimatados por duas semanas

em tanques de polietileno de 350 litros, em sistema de aquecimento de água e aeração constante, no setor de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, AM, Brasil. Durante esse período, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial contendo 32% de proteína bruta até saciedade aparente. Os parâmetros de qualidade da água foram registrados durante todo o período experimental, tais como: oxigênio dissolvido ($6,98 \pm 0,17 \text{ mg L}^{-1}$) e temperatura ($28,98 \pm 0,30 \text{ }^\circ\text{C}$) com auxílio de oxímetro digital (YSI Pro20, YSI Inc., USA), pH ($6,67 \pm 0,15$) com uso de pHmetro digital (YSI F-1100, YSI Inc., USA), alcalinidade ($5,32 \pm 1,89 \text{ mg L}^{-1}$) e dureza ($12,67 \pm 1,89 \text{ mg L}^{-1}$) por titulometria e amônia total ($0,37 \pm 0,001 \text{ mg L}^{-1}$) pelo método de endofenol, de acordo com APHA (1998).

Este estudo foi desenvolvido com a aprovação de seu protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental (protocolo 04/2017).

2.2. Obtenção dos óleos essenciais

Espécimes de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* (Registro de Acesso ao Patrimônio Genético - AB13781) foram cultivadas no setor de Plantas Medicinais e Hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, AM, Brasil). Após a colheita, folhas e rizomas das plantas foram secas à temperatura ambiente e armazenadas para extração do óleo essencial (OE), utilizando o processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger por duas horas. Os óleos essenciais obtidos foram armazenados em frascos âmbar, a -4°C . A composição química de cada óleo foi determinada por cromatografia gasosa e espectrometria de massas na Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), segundo Potzernheim et al. (2012).

O material vegetal coletado foi identificado e depositado no herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (Manaus, AM, Brasil), com os números de registro 13882, 13887 e 13889 para *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*, respectivamente.

2.3. Preparo das rações

As dietas experimentais foram elaboradas contendo 32% de proteína bruta. Durante o processo de mistura dos ingredientes da dieta, os óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* foram adicionados à mistura juntamente com o óleo de canola, conforme recomendações de dos Santos et al. (2017). A mistura foi

homogeneizada, adicionada a 10% de água e peletizada utilizando um moinho industrial. Os peletes (4 mm) foram secos em estufa de circulação forçada (25 °C por 24 h). As rações foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -20 °C. Para a alimentação diária, as rações foram pesadas e mantidas sob refrigeração até o momento do fornecimento aos peixes.

2.4. Desenho experimental

Juvenis de tambaqui (n = 315, 18,72 ± 1,01 g e 10,55 ± 0,95 cm) foram distribuídos aleatoriamente em 21 tanques com capacidade de 350L (n= 15 peixes por tanque), constituindo sete tratamentos, com três repetições. Os tratamentos com óleo essencial, administrados via dieta, foram: 1) 0 g kg⁻¹ (controle); 2) 0,625 g kg⁻¹ e 3) 1,25 g kg⁻¹ de OE *L. sidoides*; 4) 1,25 g kg⁻¹ e 5) 5,0 g kg⁻¹ de OE *O. gratissimum*, 6) 1,25 g kg⁻¹ e 7) 5,0 g kg⁻¹ de OE *Z. officinale*.

Os peixes foram alimentados com as dietas-teste duas vezes ao dia até saciedade aparente, durante 60 dias. Nos tempos de 30 e 60 dias foi realizada a biometria e coleta de sangue dos peixes (n = 9 / tratamento), visando à avaliação do desempenho de crescimento, determinação de parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos do tambaqui. Após 60 dias de alimentação, os peixes foram desafiados com a bactéria *A. hydrophila* e a mortalidade acompanhada por um período de 10 dias.

2.5. Desempenho de crescimento

Ao final de 60 dias de alimentação os parâmetros de desempenho zootécnico dos peixes foram calculados, de acordo com Dairiki et al. (2013), a saber: peso inicial e final (PI e PF, g), comprimento final (CF, cm), ganho de peso (GP, g) = peso final - peso inicial, conversão alimentar, CA = consumo de ração / ganho de peso, fator de condição, FC = (peso final / comprimento final)³ × 100 e sobrevivência (S, %) = número final de peixes / número inicial de peixes) x 100.

2.6. Desafio com *Aeromonas hydrophila*

A bactéria *A. hydrophila* (ATCC 7966) foi cultivada em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) a 35 °C por 24 h no Laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM. Em seguida, amostras do crescimento bacteriano foram diluídas em solução salina estéril e a absorbância ajustada a 550 nm em

espectrofotômetro para obtenção de contagem de células viáveis de $1,6 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Essa concentração foi estabelecida em ensaios anteriores (Oliveira et al., 2018).

Após 60 dias de alimentação, os peixes pertencentes aos diferentes tratamentos (n = 9 peixes por tanque) foram coletados, anestesiados com 100 mg L⁻¹ de benzocaína e inoculados com 100 µL de *A. hydrophila*, aplicados por via intraperitoneal, utilizando seringas de 1 mL. Após a inoculação, os peixes foram então devolvidos para os tanques de origem e sete dias após o início do desafio bacteriano foram capturados para coleta sanguínea, e após o procedimento os peixes foram devolvidos aos tanques de origem, sendo então observados por um período de 10 dias para registros de mortalidade após desafio bacteriano.

2.7. Colheita e análises sanguíneas

Amostras de sangue foram coletadas (n= 9 por tratamento) ao final de 30, 60 dias e após desafio bacteriano. Os peixes foram previamente anestesiados (benzocaína, 100 mg L⁻¹) e o sangue obtido a partir da punção do vaso caudal, utilizando seringas contendo anticoagulante (EDTA 10%). As análises hematológicas realizadas foram o hematócrito (Hct) pela centrifugação em tubos capilares (15.000 g por 10 min) e leitura em escala padronizada. A hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometemoglobina e a contagem de eritrócitos (RBC) foi realizada em câmara de Neubauer, após diluição do sangue em solução de citrato de formol. As constantes corpusculares determinadas foram volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM), utilizando fórmulas específicas (Ranzani-Paiva et al., 2013). Além disso, extensões sanguíneas foram preparadas, fixadas com metanol e coradas com corante de Rosenfeld. Foi realizada a contagem diferencial de leucócitos e trombócitos sob microscopia de luz (200 células). A contagem do número de leucócitos, trombócitos e eritrócitos totais foi feita indiretamente nas mesmas lâminas, mas para cada 2000 células. Por fim, o sangue foi centrifugado (10.000 x g, 5 min) e as alíquotas de plasma obtidas foram armazenadas a -80 ° C para análises bioquímicas. Proteínas totais foram determinadas pelo método do biureto e a quantificação da glicose no sangue foi feita pelo método da glicose oxidase, utilizando kits comerciais (Labtest®), sendo as leituras realizadas a 550 e 500 nm, respectivamente, em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-VIS, modelo Thermo).

2.8. Análise da atividade respiratória de leucócitos

Na determinação da atividade respiratória de leucócitos utilizou-se a metodologia descrita por Biller-Takahashi et al. (2013). Em resumo, 0,1 mL de sangue coletado contendo anticoagulante (EDTA) foi adicionado a 0,1 mL de nitroblue tetrazolium (NBT) a 0,2%. A solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos, a 25 °C. Em seguida, 50 µL da suspensão resultante foi adicionada a 1,0 mL de dimetilformamida (DMF) e centrifugada a $2.500 \times g$ por 5 min. A solução final foi lida em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-VIS, modelo Thermo) a 540 nm.

2.9. Análise estatística

Os dados de desempenho de crescimento, parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunológicos e sobrevivência foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Todos os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homocedasticidade de Levene. Os parâmetros de desempenho de crescimento foram submetidos à análise de variância de um fator (one way ANOVA). Para os parâmetros hematológicos, as comparações entre os tratamentos, os tempos de amostragem e a interação entre tempo e tratamento foram realizadas mediante análise de variância de dois fatores (two way ANOVA). Os parâmetros que apresentaram diferenças significativas foram submetidos ao teste de Tukey. Em todos os testes estatísticos empregados foram admitidos 5 % de significância (Zar, 1999).

3. Resultados

3.1. Composição dos óleos essenciais

Os principais componentes dos óleos essenciais de *L. sidoides* foram timol (76,6%), *p*-cimeno (6,3%) e (β)-cariofileno (5,0%), dos 21 compostos identificados. Para o óleo essencial de *O. gratissimum* os constituintes majoritários foram eugenol (43,3%), 1,8-cineol (28,2 %) e β -selineno (5,5%), entre os 18 componentes presentes neste óleo. Já para o óleo essencial de *Z. officinale* os compostos majoritários foram geranial (23,2%), neral (16,7%) 1,8-cineole (15,8%) e canfeno (11,3%) (Tabela 1).

3.2. Desempenho de crescimento

Juvenis de tambaqui alimentados com dietas suplementadas com os óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*, por 60 dias, não apresentaram

diferenças significativas nos parâmetros de desempenho analisados como peso final, comprimento final, ganho de peso, fator de condição e sobrevivência, em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$; Tabela 2).

3.3. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Neste estudo não foram observadas alterações nos parâmetros hematológicos como hematócrito, hemoglobina, número de eritrócitos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e leucócitos totais entre os diferentes tratamentos (Tabela 3). Entretanto, para os trombócitos totais observou-se que estes valores foram significativamente maiores nos tratamentos com óleo essencial de *O. gratissimum* ($1,25 \text{ g kg}^{-1}$ e $5,0 \text{ g kg}^{-1}$) no tempo de 30 dias, bem como quando estes são comparados com os tempos de 60 dias e após o desafio bacteriano (Tabela 3). Para as proporções relativas de linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e célula granulocítica especial (CGE) não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos tratamentos com óleos essenciais e tempos de exposição ($p < 0,05$; Tabela 4).

Com relação aos parâmetros bioquímicos não foi observada diferença significativa nos valores de proteínas totais entre os tratamentos e tempos de coleta, entretanto para os valores de glicose plasmática, estes foram significativamente menores nos tratamentos com óleo essencial de *L. sidoides*, em comparação com o controle ao final de 30 dias de alimentação ($p < 0,05$; Tabela 3).

3.4. Atividade respiratória de leucócitos

A atividade respiratória de leucócitos dos tratamentos com óleo essencial de *L. sidoides* ($0,625 \text{ g kg}^{-1}$ e $1,25 \text{ g kg}^{-1}$) foram significativamente maiores nos tambaquis após o desafio com *A. hydrophila*, em comparação aos valores obtidos em 30 e 60 dias de alimentação. Os demais tratamentos não apresentaram alterações significativas ($p < 0,05$; Tabela 5).

3.5. Sobrevivência de tambaquis após desafio com *A. hydrophila*

A taxa de sobrevivência dos peixes alimentados com dieta contendo $0,625 \text{ g kg}^{-1}$ de *L. sidoides* foi significativamente superior (40%) em comparação ao grupo controle,

após 10 dias da infecção experimental com *A. hydrophila*, enquanto para os demais tratamentos não houve diferença significativa entre eles (Figura 1).

4. Discussão

4.1. Composição dos óleos essenciais

Timol (76,6%) foi o composto majoritário encontrando no óleo essencial de *L. sidoides* neste estudo, seguido pelos compostos *p*-cimeno (6,3%) e (β)-cariofileno (5,0%). Resultados semelhantes foram encontrados por Hashimoto et al. (2016) (76,6% de timol e 6,3% *p*-cimeno), Soares et al. (2017) (64,5% de timol e 11,7% *p*-cimeno) e Veras et al. (2013) (timol 84,9% e *p*-cimeno 5,33%). A presença destes dois monoterpenos de forma majoritária no óleo essencial de *L. sidoides* (timol e *p*-cimeno) contribui para melhorar a atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-helmintica deste óleo (Vázquez-Sánchez et al., 2018; Camurça-Vasconcelos et al., 2007).

Para o óleo essencial de *O. gratissimum* os compostos eugenol (43,3%), 1,8-cineol (28,2 %) e β-selineno (5,5%) são os principais constituintes deste óleo. Nos estudos de Aguiar et al. (2015), Silva et al. (2015) e Bandeira Jr et al. (2017), o eugenol também foi o componente principal mais com proporções de eugenol superiores (65,26%, 76,3%, 91,47%, respectivamente). Variações nas concentrações dos componentes químicos nos óleos essenciais das plantas medicinais em decorrência de mudanças dos fatores ambientais foram relatadas em vários estudos (Silva Lima et al., 2018; Aboukhalid et al., 2017; Stevović et al., 2011).

Dentre os constituintes do óleo essencial de *Z. officinale* destaca-se os majoritários como geranial (23,2%), neral (16,7%) e 1,8-cineole (15,8%). Brum et al. (2017), Andrade et al. (2012) e Dabague et al. (2011) obtiveram o geranial como principal composto químico do OE de *Z. officinale* (23,9%, 25,06% e 23,6-35,3%, respectivamente). Ozcan e Chalchat (2002) relataram que a variação sazonal e a localidade influenciam para que diferentes variedades de plantas, que mesmo pertencendo à mesma espécie, apresentem mudanças de seus constituintes químicos, mas que não inferem em seu potencial terapêutico. Exemplos disso são os estudos de Lagha et al. (2019), Feng et al. (2018) e Sacchetti et al. (2005), que encontraram α-zingibereno como componente principal do OE de *Z. officinale*.

4.2. Desempenho de crescimento

Os juvenis de tambaqui que foram alimentados com dietas suplementadas com os óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros de desempenho de crescimento analisados (peso final, comprimento final, ganho de peso, fator de condição e sobrevivência). De forma similar, Ahmadifar et al. (2019) avaliaram dietas contendo 0, 1, 2 e 3% de pó de *Z. officinale* na alimentação de peixe zebra (*Danio rerio*) por 60 dias e também não evidenciaram melhoras em seus parâmetros de crescimento. Além disso, Campagnolo et al. (2013) avaliando cinco rações contendo diferentes doses de um aditivo comercial micro-encapsulado, constituído pelos óleos essenciais de orégano, canela, alecrim e extrato de pimenta, nas concentrações de 0; 0,005; 0,010; 0,015 e 0,020%, para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), também não observaram alterações nos parâmetros de crescimento, peso e conversão alimentar, apesar dos níveis crescentes de óleos essenciais ao longo de 69 dias. Em outro estudo avaliando o óleo essencial de *O. gratissimum* e *Z. officinale* nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% na dieta de tilápia do Nilo por 55 dias também não relataram melhoras nos parâmetros de crescimento dos peixes para *Z. officinale*, entretanto a concentração de 0,5% do óleo essencial de *O. gratissimum* melhorou significativamente a conversão alimentar quando comparada ao grupo controle (Brum et al., 2017).

Estudos sobre a ação do óleo essencial de *L. sidoides* na dieta para peixes ainda não foram realizados, porém há relatos da ação de espécies que pertencem a este gênero na literatura, como os estudos de de Souza et al. (2019) que avaliaram o efeito da adição dietética do óleo essencial de *Lippia alba* sobre o desempenho de crescimento de juvenis de tilápia do Nilo por 45 dias, e evidenciaram que a adição de 2,0 ml de óleo essencial de *L. alba* melhorou a taxa de conversão alimentar e o fator de condição, quando comparado ao grupo controle. Do mesmo modo, Addam et al. (2019) avaliaram os efeitos da suplementação dietética da mistura de ácidos orgânicos isolados em combinação com óleo essencial de *L. origanoides* (ácidos orgânicos 0,5% + óleo essencial 0,125%) em dietas administradas para tilápia do Nilo por 30 dias, não tendo efeito positivo sobre o desempenho de crescimento e fator de condição, destacando-se que os componentes majoritários do óleo de *L. origanoides* são o carvacrol e timol, os mesmos constituintes que são também encontrados no óleo de *L. sidoides*.

É importante destacar que pesquisas direcionadas à avaliação de suplementos a base de óleos essenciais para espécies nativas do Brasil, como o tambaqui, devem ser

conduzidas, principalmente no estabelecimento de dosagens e tempo de fornecimento aos peixes para estimular o crescimento dos peixes e melhora das respostas imune (Harikrishnan et al., 2011).

4.3. Parâmetros hematológicos

Alterações no eritrograma de peixes sob efeito de diferentes óleos essenciais já foram descritos em diversas espécies de teleósteos (de Souza et al., 2019; Oliveira et al., 2018; Bandeira Jr et al., 2017; Brum et al., 2017; Soares et al., 2017; Valladão et al., 2017).

Neste estudo não foram observadas alterações significativas nos parâmetros hematológicos de tambaquis alimentados com dietas contendo óleo essencial de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*, com exceção dos trombócitos que apresetaram-se aumentados nos tratamentos com óleo essencial de *O. gratissimum*. De forma semelhante, Fadeifard et al. (2018) não relataram alterações nos parâmetros eritrocitários em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados por 21 dias com 1% de óleo essencial de *Z. officinale*, *Nigella sativa* e *Echinacea angustifolia*, mas por outro lado são capazes de melhorar alguns parâmetros imune não específicos, como o aumento do número de neutrófilos e também a capacidade de fagocitose, os quais são estimulados por uma variedade de plantas medicinais. Saccol et al. (2013) utilizando diferentes concentrações do óleo essencial de *L. alba* (0, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 ml kg⁻¹) na dieta de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) por 60 dias, também não observaram diferença significativa para os parâmetros hematológicos avaliados. Em contrapartida, Dotta et al. (2015) observaram aumento nos valores de eritrócitos, leucócitos, trombócitos e linfócitos em tilápia do Nilo, após 21 dias de administração de dietas contendo extratos de própolis e *Aloe barbadensis*, o que segundo os autores pode significar estresse ao longo do período experimental ou acúmulo do óleo essencial no organismo.

Os leucócitos são células sanguíneas de defesa em peixes teleósteos, e estão subdivididos em não granulares (linfócitos e monócitos), e granulares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e leucócitos granulares PAS positivo) (Tavares-Dias e Moraes, 2004). Nos tratamentos com óleos essenciais avaliados neste estudo não foram observadas alterações significativas na contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e CGE). Esses resultados são similares aos relatados por Ribeiro et al. (2018) que não evidenciaram alterações leucocitárias em *C.*

macropomum alimentados com diferentes níveis de inclusão do óleo essencial de *M. piperita* (0%, 0,5%, 1,0% e 1,5% kg⁻¹), após infecção por *A. hydrophila*.

Atuando no sistema de defesa também estão os trombócitos, células que exercem função importante no processo de coagulação do sangue, assim como na defesa, migrando para focos inflamatórios em processos induzidos experimentalmente (Tavares-Dias et al., 2007; Ranzani-Paiva et al., 2013). Neste estudo, a adição de 1,25 g kg⁻¹ e 5,0 g kg⁻¹ de *O. gratissimum* na dieta de tambaquis resultou no aumento significativo de trombócitos totais em 30 dias de alimentação. De Souza Silva et al. (2019) também relataram que a suplementação com 0,25% do óleo essencial de *M. piperita* resultou no aumento significativo do número de trombócitos, possivelmente dando aos animais uma resposta inespecífica mais preparada, reconhecendo a entrada de antígenos no organismo. De forma contrária aos resultados obtidos neste estudo, Brum et al. (2017) relataram que tilápia do Nilo alimentadas com 0,5%, 1,0% e 1,5% de óleos essenciais de *O. gratissimum* e *Z. officinale* adicionado à dieta por 55 dias, seguido de desafio com *S. agalactiae*, ocasionou redução nos níveis de trombócitos no tratamento com a suplementação de 1,0% de *Z. officinale*, sugerindo aumento na migração de trombócitos para os locais de lesão causada pela infecção.

Os peixes alimentados com 0,625 e 1,25 g kg⁻¹ de óleo essencial de *L. sidoides*, apresentaram níveis inferiores de glicose plasmática em comparação ao grupo controle e os demais tratamentos. A redução do nível de glicose no plasma pode estar relacionada aos compostos ativos presentes no óleo essencial de *L. sidoides* como timol, já relatado em estudos anteriores por apresentar ação anestésica (Hashimoto et al., 2016; Bianchini et al., 2017). Já nos estudos de Talpur (2014), ao avaliarem a suplementação da dieta de perca-gigante (*Lates calcarifer*) com o óleo essencial de *M. piperita* verificaram que o nível de glicose no plasma reduziu significativamente nas concentrações 4 e 5 g kg⁻¹, além de diminuição significativa pós-desafio com *Vibrio harveyi*, quando comparado com os grupos não desafiados. A diminuição da glicose também pode estar relacionada com o aumento de insulina no soro, quando do fornecimento de uma dieta com a inclusão de compostos com características imunoestimulante como os óleos essenciais, o que também pode justificar a diminuição evidenciada neste estudo, após juvenis de tambaquis serem alimentados com óleo essencial de *L. sidoides*, provavelmente por estimular a atividade de insulina, diminuindo assim o nível de glicose. Outros estudos também relataram redução no nível de glicose plasmática quando óleos essenciais são usados como alternativa imunoestimulante em dietas de peixes (Abdel-Tawwab et al., 2018).

Já os níveis de proteínas plasmáticas totais não foram influenciados pelos tratamentos com óleos essenciais. Para Melo et al (2009) a determinação da concentração de proteínas totais é de grande importância, pois são responsáveis pela pressão coloidosmótica presente no plasma. Resultados semelhantes aos deste estudo foram obtidos por de Souza et al. (2019) ao incorporar o óleo essencial de *L. alba* na ração de tilápia do Nilo, e por Ribeiro et al. (2018) ao avaliarem o óleo essencial de *M. piperita* na dieta de tambaqui por 30 dias em diferentes concentrações (0,5% 1,0% e 1,5%), ambos os autores não observaram alterações no metabolismo de proteínas.

4.4. Atividade respiratória de leucócitos

A atividade respiratória de leucócitos tem sido usada como um indicador de imunidade inespecífica em peixes (Haghighi, 2019; Talpur et al., 2013; Talpur e Ikhwanuddin, 2012). Em tambaquis, as concentrações de 0,625 g kg⁻¹ e 1,25 g kg⁻¹ do óleo essencial de *L. sidoides* promoveu o aumento da atividade respiratória de leucócitos após desafio com *A. hydrophila*. Sugere-se, portanto, que o óleo essencial de *L. sidoides* tenha estimulado a imunidade inespecífica nos juvenis de tambaqui após infecção induzida. Resultados similares foram descritos para pacus (*Piaractus mesopotamicus*) desafiados com *A. hydrophila* (Biller-Takahashi et al., 2013) e para “labeo victoria” (*Labeo victorianus*) alimentados com urtiga (*Urtica dioica*) e também desafiados com *A. hydrophila* (Ngugi et al., 2015). Aumento significativo da atividade respiratória de leucócitos foi relatada para tilápias do Nilo alimentadas com 0,5% do óleo essencial de *Z. officinale* e 0,5% e 1,5% do óleo essencial de *O. gratissimum*, seguido de desafio bacteriano com *S. agalactiae*, e os autores atribuem este fato às propriedades dos componentes químicos encontrados no óleo essencial destas plantas (Brum et al., 2017). Por outro lado, o emprego de 1,0% do óleo essencial de *M. piperita* na dieta de *C. macropomum* promoveu aumento da atividade respiratória de leucócitos em comparação ao tratamento com 0,5% do óleo essencial de *M. piperita* (Ribeiro et al., 2018). Estes estudos revelam um aumento na imunidade inespecífica dos peixes ao utilizar produtos de origem vegetal como imunoestimulantes na dieta, tornando-se uma promissora alternativa com fins profiláticos e terapêuticos para a aquicultura (Nya e Austin, 2009a,b).

4.5. Sobrevivência de tambaquis após desafio com *A. hydrophila*

A maior taxa de sobrevivência dos tambaquis, decorridos 10 dias do desafio com *A. hydrophila*, foi de 40% no tratamento com 0,625 g kg⁻¹ do óleo essencial de *L. sidoides*. Sinais clínicos característicos de infecção por *A. hydrophila*, tais como pequenas lesões superficiais, nadadeiras corroídas e hemorragias locais foram observados no grupo controle. De Souza et al. (2019) relataram sobrevivência superior a 90% em juvenis de tilápia do Nilo alimentados com 2,0 ml kg⁻¹ do óleo essencial de *L. alba* seguido de infecção por *Aeromonas* spp. Talpur et al. (2013) ao avaliarem os efeitos de *Z. officinale* como aditivo alimentar para robalo asiático (*Lates calcarifer*) em diferentes níveis na dieta (0, 1, 2, 3, 5 e 10 g kg⁻¹) por 15 dias e desafiados com *Vibrio harveyi* obtiveram a maior sobrevivência (86,6%) nos grupos alimentados com gengibre 5 e 10 g kg⁻¹ respectivamente, em relação ao controle (26,7%). Já Brum et al. (2017) utilizando 0,5% do óleo essencial de *Z. officinale* e *O. gratissimum* na dieta de tilápia do Nilo alcançaram 100% e 96,19% de sobrevivência, respectivamente, após infecção com a bactéria *S. agalactiae*, quando comparados ao grupo controle (97,14%).

Efeitos positivos na dieta de peixes também foram registrados com *Sophora flavescens*, um vegetal muito utilizado na fitoterapia chinesa, para a qual foi relatada que o tratamento com 0,100% de *S. flavescens* conferiu a melhor proteção contra infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápia, com percentual de mortalidade de 21,1% em comparação ao grupo controle que foi de 52,2% (Wu et al., 2013). A forma de administração e dose fornecida dos imunostimulantes a base de óleos essenciais na dieta supostamente influencia na capacidade de um organismo, no caso os peixes, resistirem a infecção. Neste estudo a proteção contra *A. hydrophila* pode ser atribuída ao aumento da imunidade não específica evidenciada com o uso de *L. sidoides*.

5. Conclusão

Os óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* não apresentaram efeito sobre os parâmetros de desempenho zootécnico e hematológicos. Entretanto, a adição de 0,625 g kg⁻¹ e 1,25 g kg⁻¹ de óleo essencial de *L. sidoides* na dieta de tambaquis promoveu aumento da atividade respiratória de leucócitos após infecção induzida, sendo a concentração de 0,625 g kg⁻¹ de óleo essencial de *L. sidoides* a que promoveu maior sobrevivência de tambaquis após desafio com *A. hydrophila*.

Agradecimentos

À Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (MP2 02.12.01.020.00.00), CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (nº 485993 / 2013-9) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas - FAPEAM (#PPP 392/2012) pelo apoio financeiro. À Iraní Morais pelo auxílio nas análises de parâmetros fisiológicos. P. C. Monteiro e F. R. Brandão receberam bolsa de estudos de doutorado da FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas.

Referências

- Abdel-Tawwab, M., Adeshina, I., Jenyo-Oni, A., Ajani, E.K., Emikpe, B.O., 2018. Growth, physiological, antioxidants, and immune response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.), to dietary clove basil, *Ocimum gratissimum*, leaf extract and its susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 78, 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.057>
- Abdel Rahman, A.N., ElHady, M., Shalaby, S.I., 2019. Efficacy of the dehydrated lemon peels on the immunity, enzymatic antioxidant capacity and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 505, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.051>
- Aboukhalid, K., Al Faiz, C., Douaik, A., Bakha, M., Kursá, K., Agacka-Mołodoch, M., Machon, N., Tomi, F., Lamiri, A., 2017. Influence of Environmental Factors on Essential Oil Variability in *Origanum compactum* Benth . Growing Wild in Morocco. *Chem. Biodivers.* 14, e1700158. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700158>
- Addam, K.G.S., Pereira, S.A., Jesus, G.F.A., Cardoso, L., Syracuse, N., Lopes, G.R., Lehmann, N.B., Silva, B.C., Sá, L.S., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., 2019. Dietary organic acids blend alone or in combination with an essential oil on the survival, growth, gut/liver structure and de hemato-immunological in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquac. Res.* are.14250. <https://doi.org/10.1111/are.14250>
- Aguiar, J.J.S., Sousa, C.P.B., Araruna, M.K.A., Silva, M.K.N., Portelo, A.C., Lopes, J.C., Carvalho, V.R.A., Figueredo, F.G., Bitu, V.C.N., Coutinho, H.D.M., Miranda, T.A.S., Matias, E.F.F., 2015. Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. *Eur. J.*

- Integr. Med. 7, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2014.10.005>
- Ahmadifar, E., Sheikhzadeh, N., Roshanaei, K., Dargahi, N., Faggio, C., 2019. Can dietary ginger (*Zingiber officinale*) alter biochemical and immunological parameters and gene expression related to growth, immunity and antioxidant system in zebrafish (*Danio rerio*)? *Aquaculture* 507, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.049>
- Alo, M., Anyim, C., Igwe, J.C., Elom, M., Uchenna, D.S., 2012. Antibacterial activity of water, ethanol and methanol extracts of *Ocimum gratissimum*, *Vernonia amygdalina* and *Aframomum melegueta*. *Adv. Appl. Sci. Res.* 3, 844–848.
- Andrade, M.A., Cardoso, M.G., Batista, L.R., Mallet, A.C.T., Machado, S.M.F., 2012. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: Composition, antioxidant and antibacterial activities. *Rev. Cienc. Agron.* 43, 399–408. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000200025>
- Andreo, D., Jorge, N., 2011. Capacidade Antioxidante e Estabilidade Oxidativa de *Gengiber officinale*. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúd.* 13, 33-37.
- APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation, Washington DC.
- Araújo, A.M.N. de, Oliveira, J.V., França, S.M., Navarro, D.M. A.F., Barbosa, D.R.S., Dutra, K.A., 2019. Toxicity and repellency of essential oils in the management of *Sitophilus zeamais*. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* 23, 372–377. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v23n5p372-377>
- Bandeira Jr., G., Pês, T.S., Saccol, E.M.H., Sutili, F.J., Rossi, W.R., Murari, A.L., Heinzmann, B.M., Pavanato, M.A., de Vargas, A.C., de L. Silva, L., Baldisserotto, B., 2017. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. *Ind. Crops Prod.* 97, 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.040>
- Benelli, G., Pavela, R., Maggi, F., Wandjou, J.G.N., Fofie, N.G.B.Y., Koné-Bamba, D., Sagratini, G., Vittori, S., Caprioli, G., 2019. Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from *Ocimum gratissimum* grown in Ivory Coast: Efficacy on insect pests and vectors and impact on non-target species. *Ind. Crops Prod.* 132, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.047>
- Benovit, S.C., Gressler, L.T., Silva, L.L., Garcia, L.O., Okamoto, M.H., Pedron, J.S., Sampaio, L.A., Rodrigues, R.V., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2012.

- Anesthesia and Transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with Essential Oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. J. World Aquac. Soc. 43, 896–900. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00604.x>
- Bianchini, A.E., Garlet, Q.I., da Cunha, J.A., Bandeira Junior, G., Brusque, I.C.M., Salbego, J., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2017. Monoterpenoids (Thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): Evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. Brazilian J. Med. Biol. Res. 50, 1–8. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20176346>
- Biller-Takahashi, J., Takahashi, L., Saita, M., Gimbo, R., Urbinati, E., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. Brazilian J. Biol. 73, 425–429. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842013000200026>
- Boijink, C.L., Queiroz, C.A., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Inoue, L.A.K.A., 2016. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). Aquaculture 457, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.010>
- Brasil, 2015. Monografia da espécie *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca). Ministério da Saúde e ANVISA.
- Brasil, 2009. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Ministério da Saúde. Brasília-DF.
- Brito, D.I.V., Morais-Braga, M.F.B., Cunha, F.A.B., Albuquerque, R.S., Carneiro, J.N.P., Lima, M.S.F., Leite, N.F., Souza, C.E.S., Andrade, J.C., Alencar, L.B.B., Lavor, A.K.L.S., Figueredo, F.G., Lima, L.F., Coutinho, H.D., 2015. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. Rev. Bras. Plantas Med. Campinas 17, 836–844. <https://doi.org/10.1590/1983-084X/14>
- Brum, A., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2017. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture 468, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.020>
- Bulfon, C., Volpatti, D., Galeotti, M., 2015. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. Aquac. Res. 46, 513–551. <https://doi.org/10.1111/are.12238>
- Campagnolo, R., Freccia, A., Bergmann, R.R., Meurer, F., Bombardelli, R.A., 2013. Óleos essenciais na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo. Rev. Bras. Saude e

- Prod. Anim. 14, 565–573. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402013000300020>
- Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Maciel, M. V., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., Braga, R.R., Silva, R.A., Vieira, L.S., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. Vet. Parasitol. 148, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.012>
- Cavalcanti, S.C.H., Niculau, E.S., Blank, A.F., Câmara, C.A.G., Araújo, I.N., Alves, P.B., 2010. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). Bioresour. Technol. 101, 829–832. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.053>
- Melo, D.C., Oliveira, D.A.A., Melo, M.M., Júnior, D.V., Teixeira, E.A., Guimarães, S.R., 2009. Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 61, 1183–1190.
- Dabague, I.C.M., Deschamps, C., Mógor, A.F., Scheer, A.P., Côcco, L., 2011. Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) após diferentes períodos de secagem. Rev. Bras. Plantas Med. 13, 79–84. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000100012>
- Dairiki, J.K., Correa, R.B., Inoue, L.A.K.A., Morais, I.S., 2013. Feijão-caupi autoclavado na nutrição de juvenis de tambaqui. Pesqui. Agropecu. Bras. 48, 450–453. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000400014>
- de Castro, J., Monteiro, O., Coutinho, D., Rodrigues, A., da Silva, J., Maia, J., 2019. Seasonal and Circadian Study of a Thymol/ γ -Terpinene/p-Cymene Type Oil of *Ocimum gratissimum* L. and its Antioxidant and Antifungal Effects. J. Braz. Chem. Soc. 30, 930–938. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180237>
- de Souza, R.C., de Souza, E.M., da Costa, M.M., Melo, J.F.B., Baldisserotto, B., Copatti, C.E., 2019. Dietary addition of the essential oil from *Lippia alba* to Nile tilapia and its effect after inoculation with *Aeromonas* spp. Aquac. Nutr. 25, 39–45. <https://doi.org/10.1111/anu.12827>
- de Souza Silva, L.T., Pereira, U.P., de Oliveira, H.M., Brasil, E.M., Pereira, S.A., Chagas, E.C., Jesus, G.F.A., Cardoso, L., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2019. Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of *Mentha piperita* after challenge with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture 506, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.035>
- dos Santos, A.C., Sutili, F.J., Heinzmann, B.M., Cunha, M.A., Brusque, I.C.M.,

- Baldisserotto, B., Zeppenfeld, C.C., 2017. *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: Blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. Fish Shellfish Immunol. 62, 213–216. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.032>
- Dotta, G., Brum, A., Jeronimo, G.T., Maraschin, M., Martins, M.L., 2015. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária 24, 66–71. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612015004>
- Elpo, E.R.S., Negrelle, R.R.B., 2004. *Zingiber officinale* Roscoe: Aspectos botânicos e ecológicos. Visão Acadêmica 5, 27–32. <https://doi.org/10.5380/acd.v5i1.539>
- Fadeifard, F., Raissy, M., Jafarian, M., Boroujeni, H.R., Rahimi, M., Faghani, M., 2018. Effects of black seed (*Nigella sativa*), ginger (*Zingiber officinale*) and cone flower (*Echinacea angustifolia*) on the immune system of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 40, 199–204.
- Feng, J., Du, Z., Zhang, L., Luo, W., Zheng, Y., Chen, D., Pan, W., Yang, Z., Lin, L., Xi, L., 2018. Chemical Composition and Skin Protective Effects of Essential Oil Obtained from Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). J. Essent Oil Bear Pl. 21, 1542–1249. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1533436>
- Figueiredo, H.C.P., Leal, C.A., 2008. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. Rev. Bras. Zootec. 37, 08–14.
- FAO - Food and Agriculture Organization, 2018. World Fisheries and Aquaculture Sofia Report.
- Gomes, S.P., Favero, S., 2011. Avaliação de óleos essenciais de plantas aromáticas com atividade inseticida em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae). Acta Sci. - Heal. Sci. 33, 147–151. <https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v33i2.9531>
- Haghighi, M., 2019. Effect of *Origanum vulgare* Extract on Immune Responses and Hematological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Oceanogr. Fish. Open access J. 6. <https://doi.org/10.19080/foaj.2018.06.555687>
- Haghighi, M., Rohani, M.S., 2013. The effects of powdered ginger (*Zingiber officinale*) on the haematological and immunological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Med. Plant Herb. Ther. Res 1, 8–12.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. Aquaculture 317, 1–

15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>
- Hashimoto, G.S., Neto, F.M., Ruiz, M.L., Acchile, M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., 2016. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture* 450, 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.029>
- Hossain, S., De Silva, B.C.J., Wimalasena, S.H.M.P., Pathirana, H.N.K.S., Heo, G.J., 2019. *In vitro* antibacterial effect of ginger (*Zingiber officinale*) essential oil against fish pathogenic bacteria isolated from farmed olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Korea. *Iran. J. Fish. Sci.* 18, 386–394. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2018.119853>
- IBGE, 2017. Produção pecuária municipal 2017. Inst. Bras. geografia e estatística.
- Kreutz, L.C., Canova, R., Nied, C.O., Bortoluzzi, M., Frandoloso, R., 2016. Characterization of an IgM-like immunoglobulin from silver catfish (*Rhamdia quelen*) serum and its use for the production of polyclonal antibodies and development of immunoassays. *Pesqui. Vet. Bras.* 36, 819–825. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000900005>
- Lagha, R., Abdallah, F.B., AL-Sarhan, B.O., Al-Sodany, Y., 2019. Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. *Molecules* 24, 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules24061161>
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2000. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, Sp.
- Majolo, C., Pilarski, F., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.R., Chagas, E.C., 2018. Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil. *J. Essent. Oil Res.* 30, 388–397. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1487343>
- Mattos, S.H., Innecco, R., Marco, C.A., Araújo, A.V., 2007. Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais. *Fortaleza Banco do Nord. do Bras.* 61–63.
- Moraes, F.R.; Martins, M.L., 2004. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos cultivados, in: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Eds.), *Tópicos Especiais Em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. TecArt, São Paulo, pp. 343–387.
- Ngugi, C.C., Oyoo-Okoth, E., Mugo-Bundi, J., Orina, P.S., Chemoiwa, E.J., Aloo, P.A.,

2015. Effects of dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*) on the growth performance, biochemical, hematological and immunological parameters in juvenile and adult Victoria Labeo (*Labeo victorinus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 44, 533–541. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.025>
- Nya, E.J., Austin, B., 2009a. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 32, 963–970. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01100.x>
- Nya, E.J., Austin, B., 2009b. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 32, 971–977. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01101.x>
- Oliveira, S.R.N., Oliveira, M.A.S., Brandão, F.R., Majolo, C., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., 2018. Toxicity of *Lippia origanoides* essential oil in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its effect against *Aeromonas hydrophila*. Bol. do Inst. Pesca 44, 1–7. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.346>
- Ozcan, M., Chalchat, J., 2002. Essential Oil Comosition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. Czech J. Food Sci. 20, 223–228.
- Potzernheim, M.C.L., Bizzo, H.R., Silva, J.P., Vieira, R.F., 2012. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. Biochem. Syst. Ecol. 42, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.12.025>
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. EDUEM. <https://doi.org/10.7476/9788576286530>
- Ribeiro, S.C., Malheiros, D.F., Guilozi, I.C., Majolo, C., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Silva de Assis, H.C., Tavares-Dias, M., Yoshioka, E.T.O., 2018. Antioxidants effects and resistance against pathogens of *Colossoma macropomum* (Serassalmidae) fed *Mentha piperita* essential oil. Aquaculture 490, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.024>
- Saccol, E.M.H., Uczay, J., Pês, T.S., Finamor, I.A., Ourique, G.M., Riffel, A.P.K., Schmidt, D., Caron, B.O., Heinzmann, B.M., Llesuy, S.F., Lazzari, R., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., 2013. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: An analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. Aquaculture 416–417, 244–254.

<https://doi.org/10.1016/j>

- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 621-632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>
- Silva, L.L., Garlet, Q.I., Koakoski, G., Oliveira, T.A., Barcellos, L.J.G., Baldisserotto, B., Pereira, A.M.S., Heinzmann, B.M., 2015. Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress. *Rev. Bras. Plantas Med.* 17, 215–223. https://doi.org/10.1590/1983-084x/13_034
- Silva Lima, A., Milhomem, M.N., Monteiro, S.O., Arruda, A.C.P., de Castro, J.A.M., Fernandes, Y.M.L., Maia, J.G.S., Costa-Junior, L.M., 2018. Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 117, 59–65. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5662-0>
- Sebastião, F.A., Lemos, E.G.M., Pilarski, F., 2018. Development of an Absolute Quantitative Real-Time PCR (qPCR) for the Diagnosis of *Aeromonas hydrophila* Infections in Fish. *Acta Sci. Microbiol.* 1, 23–29. <https://doi.org/10.31080/asmi.2018.01.0034>
- Snuossi, M., Trabelsi, N., Taleb, S.B., Dehmeni, A., Flamini, G., Feo, V., 2016. *Laurus nobilis*, *Zingiber officinale* and *Anethum graveolens* essential oils: Composition, antioxidant and antibacterial activities against bacteria isolated from fish and shellfish. *Molecules* 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21101414>
- Soares, B.V., Neves, L.R., Ferreira, D.O., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Gonçalves, R.A., Tavares-Dias, M., 2017. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Vet. Parasitol.* 234, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.012>
- Souza, W.M.A., Ramos, R.A.N., Alves, L.C., Coelho, M.C.O.C., Maia, M.B.S., 2010. Avaliação *in vitro* do extrato hidroalcoólico (EHA) de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrointestinais (Trichostrongylidae). *Rev. Bras. Plantas Med.* 12, 278-281. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722010000300005>
- Stevović, S., Čalić-Dragosavac, D., Mikovilović, V.S., Zdravković-Korać, S., Milojević, J., Cingel, A., 2011. Correlation between environment and essential oil production

- in medical plants. *Adv. Environ. Biol.* 5, 465–468.
- Talpur, A.D., 2014. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 420–421, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.039>
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., Ambok Bolong, A.M., 2013. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 400–401, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.043>
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture* 364–365, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.035>
- Tavares-Dias, M. e Moraes, F.R., 2004. Hematologia de peixes teleósteos.
- Tavares-Dias, M., 2018. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquat. Living Resour.* 31, 13. <https://doi.org/10.1051/alr/2018001>
- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *J. Parasit. Dis.* 41, 913–918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>
- Tavares-Dias, M., Ono, E.A., Pilarski, F., Moraes, F.R., 2007. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *J. Appl. Ichthyol.* 23, 709–712. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2007.00850.x>
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2018. South American fish for continental aquaculture. *Rev. Aquac.* 10, 351–369. <https://doi.org/10.1111/raq.12164>
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pala, G., Jesus, R.B., Kotzent, S., Costa, J.C., Silva, T.F.A., Pilarski, F., 2017. Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquac. Res.* 48, 5640–5649. <https://doi.org/10.1111/are.13386>
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2015. Phytotherapy as na alternative for treating fish disease. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 38, 417–428. <https://doi.org/10.1111/jvp.12202>
- Vázquez-Sánchez, D., Galvão, J.A., Mazine, M.R., Gloria, E.M., Oetterer, M., 2018.

- Control of *Staphylococcus aureus* biofilms by the application of single and combined treatments based in plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 286, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.007>
- Ventura, A.S., de Castro Silva, T.S., Zanon, R.B., Inoue, L.A.K.A., Cardoso, C.A.L., 2019. Physiological and pharmacokinetic responses in neotropical *Piaractus mesopotamicus* to the essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) as an anesthetic. *Int. Aquat. Res.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40071-019-0215-z>
- Veras, H.N.H., Araruna, M.K.A., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., Kerntopf, M.R., Botelho, M.A., Menezes, I.R.A., 2013. Topical antiinflammatory activity of essential oil of lippia sidoides cham: Possible mechanism of action. *Phyther. Res.* 27, 179–185. <https://doi.org/10.1002/ptr.4695>
- Wu, Ying-rui, Gong, Qing-fang, Fang, H., Liang, Wan-wen, Chen, M., He, R.ui-jie, 2013. Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.020>
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice-Hall. 663p.

Fíguas e Tabelas

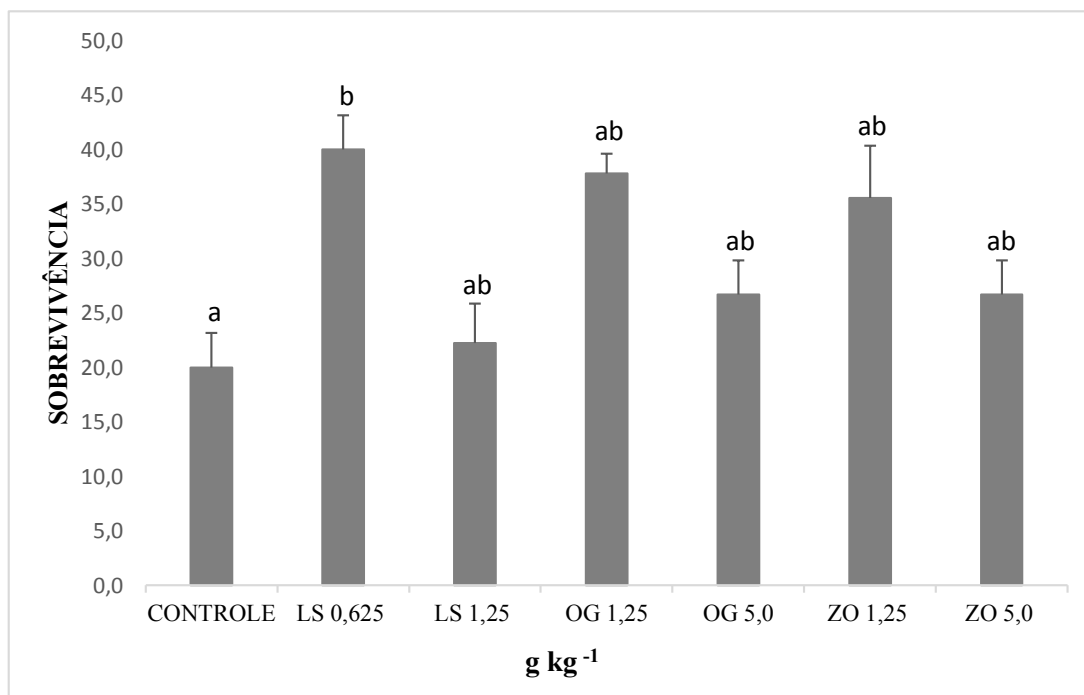


Figura 1. Taxa de sobrevivência (%) de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* por 60 dias e desafiados com a bactéria *A. hydrophila*. LS= *Lippia sidoides*; OG= *Ocimum gratissimum*; ZO= *Zingiber officinale*

Tabela 1. Composição química (%) dos óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*.

	Components	<i>L.</i> <i>sidoides</i>	<i>O.</i> <i>gratissimum</i>	<i>Z.</i> <i>officinale</i>	LRI_{lit}	LRI_{exp}
1	2-heptanone	-	-	1.0	889	890
2	tricyclene	-	-	0.3	921	922
3	α -thujene	0.3	-	-	924	929
4	α -pinene	0.1	-	2.9	932	932
5	camphene	-	-	11.3	946	947
7	sabinene	-	0.7	-	969	975
8	β -pinene	-	2.8	0.6	974	976
9	6-methyl-5-hepten-2-one	-	-	1.2	981	985
10	myrcene	1.1	0.7	1.8	988	988
11	α -phellandrene	-	-	0.3	1002	1005
12	α -terpinene	0.7	-	-	1014	1019
13	<i>p</i> -cymene	6.3	-	-	1020	1022
14	limonene	0.4	-	-	1024	1025
15	β -phellandrene	-	-	4.0	1025	1028
16	1,8-cineole	0.7	28.2	15.8	1026	1030
17	(<i>Z</i>)-ocimene	-	3.7	-	1032	1038
19	γ -terpinene	2.0	-	-	1054	1061
21	terpinolene	-	-	0.3	1086	1088
24	linalool	-	1.3	1.8	1095	1100
25	ipsdienol	0.6	-	-	1140	1148
26	camphor	-	-	0.4	1141	1142
28	citronellal	-	-	0.3	1148	1152
32	δ -terpineol	-	0.4	-	1162	1166
33	borneol	-	-	4.3	1165	1164
35	umbelulone	0.2	-	-	1167	1176
36	terpinen-4-ol	1.0	0.4	0.6	1174	1178
37	(<i>E</i>)-isocitral	-	-	0.5	1177	1182
39	α -terpineol	0.2	1.1	2.8	1186	1190
40	myrtenal	-	-	0.5	1195	1190
43	citronellol	-	-	1.0	1223	1228
45	thymol methyl ether	1.0	-	-	1232	1236
47	neral	-	-	16.7	1235	1242
49	geraniol	-	-	1.9	1249	1254
50	geranial	-	-	23.2	1264	1272
53	thymol	76.6	-	-	1289	1296
56	eugenol	-	43.3	-	1357	1357
58	α -copaene	0.4	-	-	1374	1375
59	β -bourbonene	-	0.9	-	1387	1381
60	β -elemene	-	0.8	-	1389	1389
61	(<i>E</i>)-caryophyllene	-	3.7	-	1417	1415

62	β -caryophyllene	5.0	-	-		1417
64	aromadendrene	0.4	-	-	1439	1436
65	α -humulene	0.3	0.6	-	1452	1450
67	γ -muurolene	-	0.9	-	1478	1477
68	<i>ar</i> -curcumene	-	-	1.0	1479	1481
69	β -selinene	-	5.5	-	1489	1482
70	ledene	0.3	-	-		1492
71	α -zingiberene	-	-	2.1	1493	1494
72	α -selinene	-	1.7	-	1498	1496
75	(<i>E,E</i>)- α -farnesene	-	-	1.2	1505	1508
77	7- <i>epi</i> - α -selinene	-	0.4	-	1520	1513
78	β -sesquiphellandrene	-	-	1.1	1521	1522
79	δ -cadinene	0.3	-	-	1522	1521
80	caryophyllene oxide	0.7	-	-	1582	1572
Total identified		98.6	97.1	98.9		

Retention indices in DB-5MS.

LRI_{calc}: Calculated linear retention indices, according to Van den Dool and Kratz (1963).

LRI_{lit}: Literature linear retention indices from Adams (2007).

Tabela 2. Desempenho de crescimento (média \pm desvio padrão) de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*.

Parâmetros	Controle	<i>L. sidoides</i>		<i>O. gratissimum</i>		<i>Z. officinale</i>	
		0,625 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	5,0 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	5,0 g kg ⁻¹
Peso inicial (g)	18,73 \pm 058	19,16 \pm 2,16	19,21 \pm 0,81	18,06 \pm 0,97	18,83 \pm 0,91	18,26 \pm 0,97	18,76 \pm 0,51
Peso final (g)	58,58 \pm 2,47	50,79 \pm 12,96	56,27 \pm 2,73	52,29 \pm 10,37	49,92 \pm 4,77	51,39 \pm 7,52	56,17 \pm 2,14
Comprimento final (cm)	14,53 \pm 0,18	14,42 \pm 0,84	15,06 \pm 0,10	14,22 \pm 0,92	14,28 \pm 0,82	13,89 \pm 0,63	15,01 \pm 0,29
Ganho de peso (g)	39,85 \pm 1,90	31,63 \pm 11,04	37,06 \pm 2,81	34,23 \pm 10,07	31,09 \pm 5,68	36,87 \pm 6,78	37,41 \pm 2,30
Conversão alimentar	1,68 \pm 0,08	2,41 \pm 0,74	1,89 \pm 0,09	2,07 \pm 0,61	2,26 \pm 0,34	2,19 \pm 0,55	1,90 \pm 0,11
Fator de condição	1,91 \pm 0,14	1,67 \pm 0,13	1,65 \pm 0,09	1,80 \pm 0,01	1,73 \pm 0,25	1,92 \pm 0,24	1,66 \pm 0,08
Sobrevivência (%)	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00

Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 3. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*, ao final de 30 e 60 dias de alimentação e após o desafio com *A. hydrophila*.

Parâmetros	Tempo	Controle	<i>L. sidoides</i>		<i>O. gratissimum</i>		<i>Z. officinale</i>	
			0,625 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	5,0 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	5,0 g kg ⁻¹
Hematócrito (%)	30 dias	31,00±3,54	27,89±3,30	30,89±6,21	31,22±7,71	30,67±2,74	30,56±3,68	30,67±6,30
	60 dias	28,44±4,36	28,44±4,69	31,56±4,72	28,89±4,62	28,11±3,33	28,22±4,21	28,44±3,64
	Desafio	25,11±3,02	28,11±2,03	28,00±4,47	27,11±1,36	25,67±2,24	26,00±1,41	27,33±6,87
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	30 dias	11,83±2,16	9,39±2,42	10,19±1,96	10,97±1,80	11,91±1,80	10,03±1,45	10,83±2,31
	60 dias	9,40±2,50	9,03±1,21	8,30±1,39	8,92±1,74	7,96±0,74	8,41±1,09	8,16±0,67
	Desafio	8,74±1,61	8,90±0,79	9,05±1,16	8,43±0,61	8,26±1,26	8,53±0,57	8,94±2,31
Número de eritrócitos (10 ⁶ mm ⁻³)	30 dias	2,19±0,34	1,87±0,26	2,26±0,33	2,20±0,30	2,15±0,29	2,23±0,32	2,03±0,23
	60 dias	1,79±0,40	1,56±0,26	1,68±0,56	1,87±0,38	1,82±0,40	1,69±0,21	1,97±0,51
	Desafio	1,68±0,37	1,85±0,56	1,78±0,41	1,67±0,21	1,77±0,29	1,89±0,33	1,61±0,43
Volume Corpuscular Médio (µm ³)	30 dias	145,61±34,83	152,03±29,26	140,96±39,55	146,44±46,96	145,61±27,29	139,67±28,15	153,06±36,61
	60 dias	164,20±35,84	187,08±42,93	210,99±83,96	160,69±47,35	165,51±62,25	170,02±34,78	150,57±31,02
	Desafio	156,17±39,45	168,43±64,39	160,86±26,23	163,82±17,15	148,55±27,59	140,58±20,53	174,15±36,78
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (%)	30 dias	38,40±6,97	34,27±10,31	33,69±6,52	37,20±10,06	38,85±5,09	33,09±5,34	35,75±5,84
	60 dias	33,11±7,28	32,01±3,24	26,40±3,48	32,32±11,69	28,65±4,06	30,20±4,74	28,89±2,10
	Desafio	35,07±7,23	31,68±2,13	32,67±3,94	31,10±1,53	32,17±4,02	32,82±2,01	33,65±9,13
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	30 dias	55,91±17,10	50,36±11,15	45,99±10,70	50,83±11,03	56,84±13,34	46,33±12,33	54,19±13,67
	60 dias	55,04±19,92	59,26±10,87	55,46±22,75	49,54±15,17	45,71±11,29	50,14±6,89	43,72±10,38
	Desafio	53,73±12,62	53,57±20,88	52,31±8,59	50,90±5,32	47,85±11,32	46,11±6,89	56,75±10,84
Leucócitos totais	30 dias	36842,8±10233,9	26371,2±7635,7	35095,5±12408,7	32768,8±9969,1	36469,3±7924,8	31648,7±12442,6	42982,7±11515,3

(μL^{-1})	60 dias	52931,1 \pm 12046,1	42885,0 \pm 11164,9	46971,1 \pm 21145,6	53798,3 \pm 24797,1	45868,8 \pm 22712,9	52113,3 \pm 22390,1	56296,4 \pm 20919,3
	Desafio	41010,0 \pm 17904,3	37286,6 \pm 17779,3	33572,7 \pm 12864,7	54346,1 \pm 20797,9	46617,7 \pm 14237,7	52579,4 \pm 17109,0	41608,3 \pm 10658,6
Trombócitos totais (μL^{-1})	30 dias	4409,2 \pm 1611,9 a	9568,1 \pm 6560,0 a	6630,5 \pm 2328,0 a	32768,8 \pm 9969,1 b A	36469,3 \pm 7924,8 b A	8424,3 \pm 5234,4 a	9511,6 \pm 7257,3 a
	60 dias	16006,1 \pm 8492,2	15859,4 \pm 11368,9	10768,8 \pm 8257,1	13690,0 \pm 10855,1 B	5521,1 \pm 2059,7 B	13790,5 \pm 7188,1	17441,4 \pm 12787,3
	Desafio	13396,1 \pm 12444,9	10061,1 \pm 6980,8	7866,1 \pm 2638,4	9666,1 \pm 6760,2 B	18160,0 \pm 7375,0 B	10867,2 \pm 8513,2	12442,7 \pm 5466,5
Glicose plasmática (mg dL $^{-1}$)	30 dias	79,98 \pm 13,92 a	50,70 \pm 7,70 b	55,12 \pm 8,35 b	72,55 \pm 11,54 ab	63,45 \pm 8,50 ab	72,28 \pm 23,17 ab	67,18 \pm 17,95 ab
	60 dias	68,03 \pm 11,45	60,36 \pm 11,97	59,12 \pm 6,71	67,21 \pm 11,08	61,90 \pm 4,31	60,54 \pm 6,80	59,04 \pm 10,64
	Desafio	61,66 \pm 14,71	51,32 \pm 10,07	70,34 \pm 16,00	68,25 \pm 16,22	69,72 \pm 24,21	57,60 \pm 5,91	55,75 \pm 13,55
Proteínas plasmáticas totais (g dL $^{-1}$)	30 dias	2,86 \pm 0,32	2,92 \pm 0,38	2,47 \pm 0,33	2,89 \pm 0,46	2,74 \pm 0,57	2,91 \pm 0,57	2,97 \pm 0,55
	60 dias	2,61 \pm 0,27	2,58 \pm 0,46	2,77 \pm 0,26	2,57 \pm 0,31	2,49 \pm 0,34	2,47 \pm 0,22	2,57 \pm 0,28
	Desafio	3,74 \pm 1,16	4,09 \pm 1,96	4,68 \pm 1,67	2,99 \pm 1,38	3,30 \pm 0,73	3,51 \pm 0,39	4,63 \pm 2,14

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos no mesmo tempo de amostragem. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças no mesmo tratamento entre os diferentes tempos de amostragem (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 4. Contagem diferencial de leucócitos de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*, ao final de 30 e 60 dias de alimentação e após o desafio com *A. hydrophila*.

Células (%)	Tempos de Amostragem	Controle	<i>L. sidoides</i>		<i>O. gratissimum</i>		<i>Z. officinale</i>	
			0,625 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	5,0 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	5,0 g kg ⁻¹
Linfócitos	30 dias	52,43±7,21	56,00±6,45	54,22±9,76	51,06±6,09	50,19±7,17	49,38±12,29	49,06±3,02
	60 dias	63,22±8,94	58,06±8,10	58,89±10,36	59,22±10,66	62,83±8,58	49,94±10,42	49,18±15,72
	Desafio	63,94±10,57	60,89±7,06	55,50±7,52	63,72±10,39	58,17±5,05	61,56±6,23	58,44±5,83
Monócitos	30 dias	44,36±6,82	41,00±4,79	43,17±8,70	46,06±5,03	47,19±6,30	47,19±10,44	48,67±2,81
	60 dias	33,72±6,85	40,11±7,83	39,83±9,92	40,00±10,75	36,00±8,30	47,72±8,50	38,75±12,85
	Desafio	32,56±10,38	35,44±6,04	42,78±7,69	33,33±8,45	39,00±5,41	35,61±5,97	39,78±5,25
Neutrófilos	30 dias	2,93±1,43	2,69±2,28	2,61±1,52	2,72±2,39	2,63±1,69	2,69±2,14	2,22±1,20
	60 dias	2,17±1,66	1,61±1,11	1,17±1,17	0,61±0,89	1,06±1,13	1,83±2,73	1,97±2,00
	Desafio	3,00±1,54	3,61±1,85	1,33±1,20	2,72±2,14	2,83±1,41	2,11±1,60	1,44±1,24
Eosinófilos	30 dias	0,07±0,19	0,06±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	60 dias	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,11±0,22	0,03±0,08
	Desafio	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,11±0,22	0,00±0,00
Célula Granulocítica Especial	30 dias	0,21±0,27	0,25±0,27	0,00±0,00	0,17±0,35	0,00±0,00	0,75±1,00	0,06±0,17
	60 dias	0,89±1,27	0,22±0,36	0,11±0,33	0,17±0,25	0,11±0,22	0,39±0,70	0,40±0,70
	Desafio	0,50±0,83	0,06±0,17	0,39±0,65	0,22±0,51	0,00±0,00	0,61±0,55	0,33±0,56

Letras diferentes indicam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de amostragem (Teste de Tukey, p <0,05).

Tabela 5. Atividade respiratória de leucócitos de juvenis de tabaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale*, ao final de 30 e 60 dias de alimentação e após o desafio com *A. hydrophila*.

Parâmetro	Tempos de Amostragem	Controle	<i>L. sidoides</i>		<i>O. gratissimum</i>		<i>Z. officinale</i>	
			0,625 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	5,0 g kg ⁻¹	1,25 g kg ⁻¹	5,0 g kg ⁻¹
Atividade respiratória de leucócitos	30 dias	0,48±0,07	0,49±0,13 a	0,44±0,09 a	0,49±0,12	0,52±0,12	0,39±0,10	0,41±0,11
	60 dias	0,64±0,19	0,50±0,15 a	0,57±0,12 a	0,60±0,11	0,68±0,14	0,58±0,10	0,56±0,16
	Desafio	0,58±0,22	0,81±0,20 b	0,84±0,18 b	0,60±0,24	0,62±0,18	0,61±0,23	0,58±0,25

Letras diferentes indicam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de amostragem (Teste de Tukey, p <0,05).

Considerações finais

A utilização de produtos de origem vegetal na aquicultura vem sendo priorizada, quer seja em função da comprovação de sua atividade antimicrobiana e antiparasitária, assim como pelas propriedades imunoestimulantes decorrentes de seus princípios ativos. Para isso, estudos científicos mais detalhados para validar sua atividade são necessários e assim possam ser utilizados no tratamento de doenças. As espécies *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* foram selecionadas para este estudo em razão de apresentarem em sua composição química substâncias com diversas atividades biológicas, dentre elas, antimicrobiana e imunoestimulante. Entretanto, pouco se conhece da farmacologia destes óleos essenciais em peixes, em especial em *Colossoma macropomum*, considerada uma das espécies de grande importância econômica, justificando sua escolha na realização deste estudo.

Este estudo buscou evidenciar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais supracitados em diferentes vias de administração, com o objetivo de elucidar seus diferentes mecanismos de ação. A avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* *in vitro* evidenciaram que os óleos exercem ação bactericida contra cepas de *Aeromonas hydrophila*, sendo o óleo de *L. sidoides* com melhor atividade antimicrobiana. Ao realizar os testes *in vivo*, primeiramente via banhos terapêuticos, os óleos essenciais de *O. gratissimum* e *L. sidoides* apresentaram potencial para uso no tratamento de tambaquis infectados com *A. hydrophila*. Entretanto, o emprego de 5 mg L⁻¹ de *O. gratissimum* em protocolos de banhos terapêuticos permite alcançar melhor sobrevivência (89,5%) de tambaquis e menor alteração nos parâmetros hematológicos. As alterações histopatológicas observadas no fígado de tambaquis estiveram relacionadas à infecção por *A. hydrophila*. Quando os óleos foram aplicados via suplementação na dieta, o óleo essencial de *L. sidoides* nas concentrações de 0,625 e 1,25 g kg⁻¹ promoveram aumento da imunidade inespecífica em juvenis de *C. macropomum* após infecção experimental, indicando que a concentração de 0,625 g kg⁻¹ do óleo essencial promove a redução da mortalidade de tambaquis desafiados com *A. hydrophila*, por aumentar sua resistência. Estes estudos mostraram que dependendo da via de administração dos óleos essenciais, a ação destes óleos será influenciada, ressaltando a importância de estudos como este que visem avaliar a melhor dose e principalmente melhor via de administração de um fármaco/produto natural.

Diante disso, o uso de óleos essenciais surge como uma alternativa de tratamento a fim de reduzir perdas econômicas em decorrência de altas taxas de mortalidade na piscicultura pelo estabelecimento de doenças, promovendo a inovação e oportunidades competitivas para o agronegócio da aquicultura, por meio da produção de conhecimentos técnico-científicos que irão compor a base para subsidiar o desenvolvimento de bioprodutos para uso no tratamento de doenças na piscicultura, além de minimizar o lançamento de resíduos de antimicrobianos e quimioterápicos no ambiente, bem como para elaboração de protocolos de boas práticas de manejo sanitário para a criação do tambaqui, visando reduzir ou evitar a dependência da utilização de antibióticos comerciais, o que contribuirá para o fortalecimento e consolidação do pacote de produção da principal espécie nativa cultivada no Brasil, levando em consideração a sanidade do animal tratado. Espera-se que futuramente produtos de origem vegetal possam ser utilizados em larga escala na aquicultura.