

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - FCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E
RECURSOS PESQUEIROS – PPGCARP

ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia gracilis* E *Cymbopogon citratus* NA
DIETA DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*): EFEITO SOBRE
DESEMPENHO, PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS E
RESISTÊNCIA FRENTE *Aeromonas jandaei*

KAMILA RAISSA DE SOUZA BARBOSA

MANAUS – AM
2023

KAMILA RAISSA DE SOUZA BARBOSA

ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia gracilis* E *Cymbopogon citratus* NA
DIETA DE TAMBACUI (*Colossoma macropomum*): EFEITO SOBRE O
DESEMPENHO, PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS E
RESISTÊNCIA FRENTE *Aeromonas jandaei*

Orientadora: Dra. Edsandra Campos Chagas

Coorientadora: Dra. Fernanda de Alexandre Sebastião

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros – PPGCARP, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração: Produção Animal.

MANAUS – AM
2023

Ficha Catalográfica

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

B2386 Barbosa, Kamila Raissa de Souza
Óleos essenciais de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* na dieta de tambaqui (*Colossoma macropomum*): efeito sobre desempenho, parâmetros hemato-imunológicos e resistência frente *Aeromonas jandaei* / Kamila Raissa de Souza Barbosa . 2023
66 f.: 31 cm.

Orientadora: Edsandra Campos Chagas
Coorientadora: Fernanda de Alexandre Sebastião
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Aeromonas jandaei*. 2. *Colossoma macropomum*. 3. imunoestimulante. 4. óleos essenciais. I. Chagas, Edsandra Campos. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

KAMILA RAISSA DE SOUZA BARBOSA

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia gracilis* E *Cymbopogon citratus* NA DIETA
DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*): EFEITO SOBRE
DESEMPENHO, PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS E
RESISTÊNCIA FRENTE *Aeromonas jandaei***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

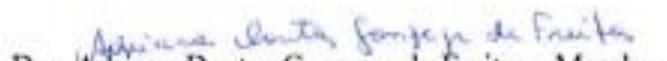
Aprovado em 28 de abril de 2023.

BANCA EXAMINADORA



Dra. Edsandra Campos Chagas - Presidente
Embrapa Amazônia Ocidental


Dra. Sílvia Umeda Gallani - Membro
Universidade Nilton Lins


Dra. Adriana Dantas Gonzaga de Freitas - Membro
Universidade Federal do Amazonas

À minha mãe que sempre me apoiou e incentivou, e ao meu amado filho Miguel ao qual
fiquei longe durante o período do mestrado

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que não me desamparou em todos os momentos em que achei que não era capaz, e que me mostrou que posso ser forte e suficiente para conquistar os meus sonhos.

Aos meus pais, Luiza Costa de Souza e Francispaulo de Castro Barbosa, que sempre acreditaram em mim e não mediram esforços para proporcionar uma boa educação a mim e aos meus irmãos. Minha eterna gratidão à minha mãe, essa mulher guerreira! Obrigada por sempre acreditar em mim e por sempre estar nos piores e melhores momentos da minha vida! Palavras não são capazes de descrever tudo o que sinto. Obrigada por cuidar tão bem do meu filho enquanto estava aqui realizando mais uma conquista.

Aos meus irmãos, Karen e Luiz, que ajudaram minha mãe com o meu filho Miguel, à minha irmã Karina que me ajudou em Manaus, muito obrigada.

À minha orientadora, Dra. Edsandra Campos Chagas, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade em poder compartilhar conhecimentos e experiências, por também estar sempre presente nas coletas, análises e elaboração dessa dissertação. Saiba que é um exemplo de profissional, e a levo como inspiração. Terá sempre minha admiração.

À minha coorientadora, Dra. Fernanda de Alexandre Sebastião, pelos ensinamentos em laboratório, apoio durante as análises e orientação na elaboração da dissertação. É um grande exemplo de profissional, meu muito obrigada.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, e a FAPEAM, pelo financiamento deste projeto.

À Embrapa Amazônia Ocidental, por toda infraestrutura concedida, juntamente a toda equipe que me ajudou durante a fase experimental e análises em laboratório desse projeto: Anthony Jasson Zubiato Augustin, Marcelo Róseo de Oliveira, Francisco Célio Maia Chaves e Sr. Marcondes.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros e às coordenadoras do curso, professoras Dra. Flávia Souza e Dra. Marcela Magalhães.

À Secretária do Curso, Antônia, pela atenção e disponibilidade.

Às amigas que fiz e que foram importantes durante as análises e execução do experimento, Rayza Lima Araújo, Damy Caroline, Luana Rubim Fernandes e Erika Romalho, meu muito obrigada!

Às minhas tias Carmem e Rose e minha avó Marilane, obrigada por tudo.

A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui.

Muito obrigada!

Nem tão longe que eu não possa ver
Nem tão perto que eu possa tocar
Nem tão longe que eu não possa crer
Que um dia chego lá
Nem tão perto que eu possa acreditar
Que o dia já chegou [...]"

Humberto Gessinger

RESUMO GERAL

A utilização de imunostimulantes alternativos na aquicultura, como os óleos essenciais, é de grande relevância, principalmente por atuar benéficamente nas respostas imunes dos peixes e por apresentar potencial antimicrobiano. Óleos essenciais (OE) de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* apresentaram ação antimicrobiana *in vitro* contra espécies de interesse na piscicultura, como *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas hydrophila*. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão do OE de *L. gracilis* e *C. citratus* na dieta de tambaqui (*Colossoma macropomum*) sobre o crescimento, respostas hematoimunológicas antes e após estímulo com *A. jandaei*. No capítulo 1, foi realizada revisão bibliográfica sobre a utilização dos OEs como imunostimulantes, e relatado como os óleos atuam melhorando parâmetros fisiológicos dos peixes. Já no capítulo 2, foi descrito o estudo *in vivo* utilizando a inclusão dos OEs de *L. gracilis* e *C. citratus* na dieta de tambaqui. O estudo foi realizado utilizando delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos (T1= 0,0 g kg⁻¹; T2= 5,0 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis*; T3= 10,0 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis*; T4= 5,0 g kg⁻¹ de OE de *C. citratus*; T5= 10,0 g kg⁻¹ de OE de *C. citratus*) e 4 repetições. Os OEs foram adicionados à ração comercial (32% PB) e esta foi fornecida aos peixes (n=240), duas vezes por dia, durante 60 dias. Após esse período, foi realizado o procedimento de biometria e coleta sanguínea dos peixes para análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas. Com relação aos parâmetros sanguíneos, não foi encontrada diferença estatística significativa (p<0,05) nos valores de hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, hemoglobina corpuscular média, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média. Tanto nos parâmetros bioquímicos - proteínas totais, albumina e globulina-, como nos parâmetros imunológicos - atividade respiratória de leucócitos e concentração de lisozima- não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com OEs. Entretanto, observou-se uma redução significativa nos valores de aspartato aminotransferase (AST) no tratamento contendo 5 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis* em relação aos demais tratamentos. Após os 60 dias de alimentação, os peixes tiveram o sistema imune estimulado com *A. jandaei* (10⁸ UFC mL⁻¹), mas não foi observada nenhuma mortalidade no período de 15 dias, assim como não houve efeito sobre a lisozima e atividade respiratória de leucócitos. Todavia, as alterações em alguns parâmetros sanguíneos 10 dias após o estímulo com a bactéria foram registradas: tratamento controle apresentou redução significativa nos valores de volume corpuscular médio (VCM) em relação ao tratamento com 5 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis*, e os valores de proteínas totais dos peixes pertencentes aos tratamentos controle e 10 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis* foram significativamente menores em

relação ao tratamento com 5 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis*. Em conclusão, a inclusão dos OEs de *L. gracilis* e *C. citratus* mostraram efeitos não-deletérios na saúde dos peixes, uma vez que não afetaram negativamente o desempenho zootécnico dos peixes, nem a taxa de sobrevivência após estímulo com *A. jandaei*.

Palavras-chave: *Aeromonas jandaei*, *Collossoma macropomum*, imunoestimulante, óleos essenciais.

ABSTRACT

The use of alternative immunostimulants in aquaculture, such as essential oils, is of great relevance, mainly because they have a beneficial effect on the immune responses of fish and because they have antimicrobial potential. Essential oils (EO) from *Lippia gracilis* and *Cymbopogon citratus* showed *in vitro* antimicrobial activity against species of interest in fish farming, such as *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas hydrophila*. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of including EO from *L. gracilis* and *C. citratus* in the diet of tambaqui (*Colossoma macropomum*) on growth, hemato-immunological responses before and after stimulation with *A. jandaei*. In chapter 1, a bibliographical review was carried out on the use of EOs as immunostimulant and reported how the oils act by improving the physiological parameters of the fish. In chapter 2, the *in vivo* study using the inclusion of *L. gracilis* and *C. citratus* EOs in the tambaqui diet was described. The study was carried out using a completely randomized design, with 5 treatments (T1= 0.0 g kg⁻¹; T2= 5.0 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO; T3= 10.0 g kg⁻¹ of EO of *L. gracilis*; T4= 5.0 g kg⁻¹ of *C. citratus* EO; T5= 10.0 g kg⁻¹ of *C. citratus* EO) and 4 repetitions. The EOs were added to the commercial feed (32% CP) and this was given to the fish (n=240), twice a day, for 60 days. After this period, the procedure of biometrics and blood collection of the fish was carried out for hematological, biochemical and immunological analyses. With regard to blood parameters, no statistically significant difference (p<0.05) was found in the values of hematocrit, hemoglobin, erythrocytes, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration. Both in the biochemical parameters - total proteins, albumin and globulin - and in the immunological parameters - respiratory activity of leukocytes and concentration of lysozyme - there were no statistical differences between the treatments with EOs. However, a significant reduction in aspartate aminotransferase (AST) values was observed in the treatment containing 5 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO compared to the other treatments. After 60 days of feeding, the fish had their immune system stimulated with *A. jandaei* (10⁸ CFU mL⁻¹), but no mortality was observed in the 15-day period, as well as there was no effect on lysozyme and respiratory activity of leukocytes. However, changes in some blood parameters 10 days after the challenge with the bacteria were recorded: control treatment showed a significant reduction in mean corpuscular volume (MCV) values in relation to treatment with 5 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO, and the total protein values of fish belonging to the control treatments and 10 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO were significantly lower in relation to the treatment with 5 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO. In conclusion, the inclusion of EOs from *L. gracilis* and *C. citratus* showed non-deleterious effects on fish

health, since they did not negatively affect the zootechnical performance of the fish, nor the survival rate after challenge with *A. jandaei*.

Keywords: *Aeromonas jandaei*, *Colossoma macropomum*, immunostimulant, essential oil.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1. Vantagens e desvantagens do modo de administração dos imunoestimulantes naturais.....22

Tabela 2. Efeito dos óleos essenciais sobre o desempenho zootécnico de algumas espécies de peixes.....25

Tabela 3. Efeito da suplementação de diferentes óleos essenciais sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos de peixes.....30

Tabela 4. Efeito dos diferentes óleos essenciais sobre os parâmetros imunológicos e sobrevivência dos peixes frente ao desafio com bactérias.....32

CAPITULO 2

Tabela 1. Desempenho de crescimento (média \pm erro padrão) de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* na dieta.....52

Tabela 2. Parâmetros hematológicos e bioquímicos (média \pm erro padrão) de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* na dieta antes e após estimulação com *Aeromonas jandaei*.....54

Tabela 3. Parâmetros imunológicos (média \pm erro padrão) de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* na dieta antes e após estimulação com *Aeromonas jandaei*.....55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. HIPÓTESES	17
Capítulo 1	18
1. Introdução	19
2. Óleos essenciais	21
2.1 Características dos óleos essenciais	21
2.2 Modo de administração para organismos aquáticos	22
2.3 Mecanismo de ação.....	22
3. Efeito sobre o desempenho dos peixes	23
4. Hematologia, bioquímica e parâmetros imunológicos dos peixes	27
5. Considerações finais	35
Referências	35
Capítulo 2	43
1. Introdução	46
2. Material e métodos	48
2.1 Animais	48
2.2 Óleos essenciais	48
2.3 Dietas experimentais.....	49
2.4 Desenho experimental.....	49
2.5 Parâmetro de desempenho	50
2.6 Coleta sanguínea, análises hematológicas e bioquímicas.....	50
2.7 Atividade respiratória de leucócitos.....	51
2.8 Análise de lisozima	51
2.9 Estimulação da resposta imune com <i>Aeromonas jandaei</i>	51
2.10 Análise estatística	52
3. Resultados	52
4. Discussão	55
5. Conclusão	59
Referências	59
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	65

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil apresenta grande potencial de expansão para a piscicultura, e isso se deve principalmente ao fato de haver características favoráveis para a criação de peixes, como possuir uma das maiores bacias hidrográficas do mundo, temperaturas amenas que favorecem a sobrevivência de diversas espécies aquáticas, além de um mercado para o pescado já consolidado (VALENTI et al., 2021). No país, a piscicultura contribuiu com 84,4% da produção total da aquicultura em 2021, e as principais espécies cultivadas foram a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), com 63,1% e 16,7%, respectivamente (IBGE, 2021).

No país, cerca de 80% da produção tanto de espécies exóticas, como a tilápia do Nilo, e nativas, como o tambaqui, são realizadas em tanques escavados (VALENTI et al., 2021). Esse sistema de criação utiliza altas densidades de estocagem, com o intuito de se obter maior produção e atender a alta demanda do mercado consumidor (VALENTI et al., 2021). Todavia, os peixes quando estocados em altas densidades e, que unidos a outros fatores, como má qualidade da água e manejo inadequado, podem aumentar os níveis de estresse dos peixes, e torna-los mais susceptíveis a patógenos, culminando na morte em massa nos lotes e causando prejuízos aos produtores (COSTA et al., 2019).

Bactérias patogênicas podem se disseminar nas pisciculturas e causar grandes prejuízos à produção, e um dos gêneros de bactérias que mais podem ocasionar doenças em peixes é o de *Aeromonas* (PEREIRA et al., 2022). Esse gênero é composto por bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, em forma de bastonetes. Estão reconhecidas cerca de 36 espécies e algumas são capazes de afetar humanos, causando infecções gastrointestinais (FERNANDEZ-BRAVO e FIGUERAS, 2020). As espécies mais conhecidas são *Aeromonas hydrophilla*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii* e *A. jandaei*.

A utilização de antimicrobianos sintéticos no tratamento de doenças bacterianas tem se tornado um assunto com amplas discussões, principalmente devido à capacidade de ocasionar maior resistência nessas espécies (EL-SHERBENY; KHORIS; KASSEM, 2022). No estudo de Gallani et al. (2020) foi observado que cepas de *A. hydrophila* isoladas de tambaqui em um surto de septicemia hemorrágica em 2016, apresentaram resistência a ampicilina, amoxicilina, penicilina, dentre outros antimicrobianos. Todavia, o mesmo estudo demonstrou que as cepas possuíam sensibilidade aos OEs de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). De forma semelhante, da Silva et al. (2022) verificou a ação dos óleos essenciais de *Lippia gracilis*, *Cymbopogon citratus*, *Aloysia triphylla*, *Croton cajucara*

(morfotipo vermelho e branco) contra cepas de *A. hydrophilla* e *A. jandaei* evidenciando o potencial de produtos de origem vegetal e a necessidade de buscas por mais produtos alternativos.

Atualmente uma das práticas utilizadas para minimizar as respostas de estresse dos peixes de produção e aumentar a resposta contra patógenos, consiste na estimulação do sistema imune, com emprego de aditivos alimentares (ELUMALAI et al., 2021; SHOURBELA et al., 2021). Dentre os aditivos naturais com características imunoestimulantes, destacam-se os óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, que já possuem resultados bastante promissores (SHOURBELA et al., 2021), especialmente com OEs obtidos a partir de plantas das famílias Verbenaceae, Alliaceae, Lamiaceae e Zingiberaceae (RODRIGUES et al., 2020; MONTEIRO et al., 2021; CHUNG et al., 2021).

Compostos naturais, como os óleos essenciais, são importantes aliados na atualidade, e na área de produção animal vem ganhando espaço, permitindo a utilização de protocolos de caráter sustentável para o tratamento de enfermidades (DAWOOD et al., 2021). Desse modo, o presente trabalho objetivou apresentar como primeiro capítulo uma revisão bibliográfica sobre a utilização de imunoestimulantes naturais na piscicultura e, no capítulo 2, um ensaio *in vivo* com tambaquis alimentados com ração adicionada de óleos essenciais de *L. gracilis* e de *C. citratus*, visando determinar os efeitos sobre o desempenho produtivo, parâmetros hematoimunológicos e sobrevivência dos peixes após estímulo com *A. jandaei*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da inclusão do óleo essencial de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* na dieta de tambaqui (*Colossoma macropomum*) sobre o crescimento, respostas hematoimunológicas antes e após estímulo com *Aeromonas jandaei*.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os parâmetros de desempenho zootécnico de *C. macropomum* alimentados com dietas contendo os óleos essenciais de *L. gracilis* e *C. citratus*;

Avaliar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos de tambaquis que receberam a suplementação dietária dos óleos essenciais de *L. gracilis* e *C. citratus* após período de alimentação e após estímulo bacteriano;

Avaliar a sobrevivência de *C. macropomum* inoculados experimentalmente com dose-estímulo (10^8 UFC/mL) da bactéria *A. jandaei*.

3. HIPÓTESES

- Os óleos essenciais de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* influenciam no maior desempenho do tabaqui.
- Os óleos essenciais de *L. gracilis* e *C. citratus* atuam na modulação das respostas hemato-imunológicas de tabaqui sem causar danos hepáticos.
- Tabaquis alimentados com dietas contendo 5,0 g kg⁻¹ dos óleos essenciais de *L. gracilis* e *C. citratus* por 60 dias, apresentam maior estímulo do sistema imune comparados ao tratamento controle, após inoculação da bactéria *A. jandaei*.

Capítulo 1

Óleos essenciais como imunoestimulante: efeito sobre desempenho e saúde dos peixes

Artigo elaborado conforme as normas da Aquaculture

Óleos essenciais como imunestimulante: efeito sobre desempenho e saúde dos peixes

Kamila Raissa de Souza Barbosa^a, Fernanda de Alexandre Sebastião^{a,b}, Francisco Célio Maia Chaves^b, Edsandra Campos Chagas^{a,b}

^aPrograma de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1.200, Coroado I, 69.067-005, Manaus, AM, Brasil.

^bEmbrapa Amazônia Ocidental, AM-010, Km 29, Caixa postal 319, 69.010-970, Manaus, AM, Brasil.

Resumo

A busca por alternativas que melhorem a saúde e a produção de peixes vem crescendo ao longo dos anos. Uma alternativa promissora é a utilização dos óleos essenciais (OEs) como aditivo na dieta dos peixes, principalmente porque eles são biodegradáveis e por isso, menos tóxicos ao ambiente. Os OEs atuam aumentando a resposta imune, conseqüentemente melhorando o estado de saúde dos peixes, permitindo que os mesmos possam ter melhor desempenho zootécnico e resistência a doenças. Várias pesquisas mostram os benefícios dos OEs sobre aspectos fisiológicos dos peixes, logo, essa revisão aborda os efeitos dos óleos essenciais sobre parâmetros zootécnicos, hematológicos, bioquímicos e imunológicos dos peixes, mostrando o efeito imunestimulante dessas substâncias.

Palavras-chave: aditivos, hematologia, parâmetros imunológicos, piscicultura, produtos naturais.

Abstract

The search for alternatives that improve the health and production of fish has been growing over the years. A promising alternative is the use of essential oils (OEs) as an additive in the fish diet, mainly because they are biodegradable and therefore less toxic to the environment. The EOs act by increasing the immune response, consequently improving the health status of the fish, allowing them to have better zootechnical performance and disease resistance. Several studies show the benefits of EOs on physiological aspects of fish, so this review addresses the effects of essential oils on zootechnical, hematological, biochemical and immunological parameters of fish, showing the immunostimulant effect of these substances.

Keywords: additives, hematology, immunological parameters, fish-farming, natural products.

1. Introdução

A aquicultura é um dos seguimentos do setor primário que mais se desenvolve na atualidade. De acordo com a FAO (2020), a produção aquícola mundial cresceu cerca de 5,3% ao ano entre 2001 e 2018, com uma produção estimada em 178 milhões de toneladas em 2020 (FAO, 2022). Além disso, a taxa de consumo de peixes foi maior que outras proteínas de origem animal, tornando a aquicultura uma grande fonte de renda e alimento para a população (Hilsdorf et al., 2022). No Brasil, a produção total da aquicultura foi cerca de 643 mil toneladas, com a produção de peixes ocupando 85,7% desse total, principalmente devido à produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) produzida majoritariamente na região sul e sudeste, e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) com maior cultivo na região norte. Entre outras espécies criadas no país encontra-se a carpa comum (*Cyprinus carpio* L.) cultivada principalmente no sul e o híbrido tambacu (*Colossoma macropomum x Piaractus mesopotamicus*) com maior produção na região centro-oeste (IBGE, 2020).

Na busca por maiores lucros têm sido adotados sistemas intensivos de criação de peixes, com uso de altas densidades de estocagem, aeração constante, uso de rações adequadas para cada fase de criação, e renovação de água (Valenti et al., 2021; Hilsdorf et al., 2022). Nesses sistemas, quando não há o emprego de boas práticas de manejo pode ocorrer uma condição de estresse, com possibilidade de desencadear diversos problemas sanitários, uma vez que essa condição torna os peixes mais susceptíveis a surtos de mortalidade por patógenos, sendo necessária a utilização de alternativas que possam diminuir perdas na aquicultura (da Costa et al., 2019; Li et al., 2021).

É comum a utilização de antimicrobianos sintéticos e quimioterápicos para tratar doenças na piscicultura, no entanto, há uma busca pela diminuição da utilização desses fármacos, já que podem causar prejuízos ao meio ambiente, aos animais e aos consumidores, principalmente devido à seleção de bactérias mais resistentes (Deekshit et al., 2023). Outro fator é a ausência de produtos antimicrobianos autorizados para uso na piscicultura indicados para determinadas espécies, como os peixes nativos (Barcellos, 2022). Esses fatores tornam necessária a busca por alternativas que tragam bons resultados para a piscicultura e que possam ser menos nocivas de forma geral (Edeh e Nsofor, 2023).

A utilização de aditivos naturais que estimulam o sistema imunológico dos peixes é bem-vista, pois podem reduzir mortalidades e o uso de quimioterápicos após surtos de doenças (Zhu, 2020). Assim, muitos pesquisadores têm enfatizado o uso de óleos essenciais (OEs) de diferentes plantas na piscicultura, principalmente devido às suas atividades antimicrobianas, antioxidantes e imunoestimulantes (Tavares-Dias, 2018; Chagas et al., 2020; Chung et al., 2021a; da Silva et al., 2022). Estudos mostram o efeito positivo dos OEs sobre diversos

parâmetros fisiológicos dos peixes, como por exemplo no desempenho zootécnico, pois podem estimular enzimas envolvidas na digestão (Copatti et al., 2022), além de melhorar a absorção de nutrientes (Valladão et al., 2017; Abdel-Latif et al., 2020a), bem como sobre a saúde, influenciando no aumento da resistência contra patógenos. Além disso, os OEs são biodegradáveis, o que favorece seu uso na prática da aquicultura sustentável (Mohamed et al., 2021; Miura et al., 2021).

Essa revisão de literatura busca mostrar a ação imunoestimulante dos OEs para os peixes, com ênfase em parâmetros zootécnicos, hematológicos, bioquímicos e imunológicos.

2. Óleos essenciais

2.1 Características dos óleos essenciais

A utilização dos OEs já acontece há 5.000 anos, ao qual o isolamento desse componente da plantas aromáticas era obtido para utilização na produção de perfumes, remédios e para dar aroma e sabor aos alimentos (Mucha e Witkowska, 2021). Atualmente, encontra-se OEs em diferentes produtos como conservante de alimentos, em diferentes cosméticos (Brut, 2020; Schmidt, 2020; Jugreet et al., 2020) e também como fármaco utilizado em tratamentos como, dermatites, como antiviral, além de ser usado na aromaterapia (Harris, 2020).

Os OEs são constituídos por compostos fenólicos, polifenóis, polipeptídios, alcaloides (García-Márquez et al., 2021), e principalmente por terpenos e terpenóides. Estes são responsáveis pela característica aromática das plantas, sendo os monoterpenos e os sesquiterpenos os compostos principais, constituindo cerca de 80% dos óleos. São esses compostos que atuam na função antimicrobiana, antioxidante e imunoestimulante dos OEs (Cui et al., 2019; Masyita et al., 2022). O efeito dos OEs ocorre principalmente pela sinergia entre os compostos majoritários e/ou pela ação dos constituintes presentes em menor quantidade nos OEs (García-Márquez et al., 2021). Tem-se observado que os constituintes dos OEs, variam de acordo com o estudo. As variações compreendem: origem da planta, clima e solo da região, período de colheita, parte da planta coletada para extração do OE, condições de armazenamento, forma de extração (Madhupriya et al., 2018). Ressalta-se a importância de se determinar a composição química dos OEs por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, quando utilizados em ensaios biológicos (Chagas et al., 2020). O método mais comum de obter os OEs baseado em 21 artigos analisados é através da hidrodestilação. Outro método utilizado é por arraste a vapor, podendo ser utilizado diferentes partes das plantas, como raiz, folha, caule e sementes (Tavares-Dias, 2018; Ribeiro et al., 2018; Monteiro et al., 2021).

2.2 Modo de administração para organismos aquáticos

Existem vários métodos de administração de produtos visando a recuperação dos peixes doentes em ambientes cultivados, assim como existem métodos quando o objetivo é a imunostimulação. As substâncias advindas das plantas como os OEs e extratos vegetais podem ser administradas aos peixes, através da dieta, como aditivos alimentares, injetáveis ou por banhos terapêuticos (Elumalai et al., 2020). Para escolha da via de administração mais adequada, deve-se considerar a finalidade, o tipo de criação e a espécie cultivada (Gabriel, 2019). Na Tabela 1, é possível observar as vantagens e desvantagens de cada método.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens do modo de administração dos imunostimulantes naturais.

Modo de administração	Vantagens	Desvantagens	Referências
Aditivo alimentar	Manejo menos estressante, menor custo de mão de obra, fácil administração aos peixes.	Concentrações ideais não padronizadas.	Stevanovic et al. (2018)
Banho terapêutico	Eficaz contra parasitos e no controle de infecções bacterianas	Estresse de manejo, elevada dose do produto.	Gabriel (2019); Rodrigues et al. (2020)
Injetável	Eficaz em prevenir doenças virais e bacterianas.	Laboriosa, alto custo de produção, estresse de manejo, pouco recomendado em peixes pequenos.	Rodrigues et al. (2020); Zhang et al. (2022)

Os óleos adicionados à dieta são utilizados principalmente como aditivo imunostimulante e promotor de crescimento, para melhorar o desempenho e saúde dos peixes (de Souza et al., 2019a; de Souza et al., 2019b). O efeito imunostimulante dos OEs ocorre através da melhora das respostas do sistema imune inato, através da ativação das vias de defesa (Gupta et al., 2021a), além de servir na profilaxia de diversas doenças (Stratev et al., 2018).

2.3 Mecanismo de ação

Os OEs vêm sendo utilizados há muito tempo na medicina tradicional (Zargar et al., 2019), e mais recentemente como aditivos nas dietas dos animais para maior desempenho e bem-estar durante a produção (Singh e Gaikwad, 2020). Devido à comprovada ação antimicrobiana, antiparasitária e imunostimulante desses óleos, a utilização deles na

aquicultura ocorre principalmente com o objetivo de tratar e prevenir a ocorrência de doenças (Zhu, 2020).

O mecanismo de ação dos OEs sobre os microrganismos acontece principalmente pela característica lipofílica dessas substâncias, juntamente com uma cascata de reações envolvendo a célula do patógeno, ou seja, os OEs agem alterando a permeabilidade da membrana da parede celular bacteriana ou do parasito, ocasionando o extravasamento celular e levando a perda de íons e falhas nas bombas de prótons (Cui et al., 2019; Dawood et al., 2021). Esses processos resultam na coagulação dos componentes presentes no citoplasma e na quebra das camadas lipídicas e proteicas dos microrganismos, levando o patógeno à morte ou a sua inativação (Hassoun e Çoban, 2017; Cunha et al., 2018; Cui et al., 2019; Dawood et al., 2021). Já existem trabalhos mostrando essas alterações em parasitas de peixes, como monogenéticos e, acantocéfalos (Tavares-Dias, 2018). No trabalho de Gonzales et al. (2020) observou-se que o OE de *Cymbopogon citratus* (capim santo) causou danos e perfurações ao tegumento da *Monogenea*, além de imobilização total 7 horas após a exposição do parasita ao OE. Em outra pesquisa, os OEs de *Lippia sidoides* (alecrim pimenta) e *L. origanoides* causaram edema, vacuolização e lise em monogenéticos (Brasil et al., 2019), já o OE de *Aloysia triphylla* ocasionou edema, inchaço no corpo e degeneração dos órgãos reprodutores no acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* (Oliveira et al., 2021).

Em bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, os OEs de orégano (*Origanum vulgare*) (Cui et al., 2019) e gengibre (*Zingiber officinale*) (Wang et al., 2020) ocasionaram danos à superfície bacteriana, com vazamento de conteúdo intracelular e inibição do metabolismo respiratório (Cui et al., 2019). Em relação às bactérias de relevância para piscicultura, Liang et al. (2022) verificou que o timol (composto presente em diversos OEs, como orégano e tomilho -*Thymus vulgaris*) atuou na deformação da célula bacteriana, separando a membrana plasmática da parede celular, com consequente perda de conteúdo citoplasmático, levando à lise da bactéria.

3. Efeito sobre o desempenho dos peixes

O uso de OEs nas dietas de peixes vem sendo bastante estudado, pois podem atuar da mesma forma que os prebióticos, modulando a microbiota intestinal, inibindo principalmente a proliferação de organismos patogênicos e favorecendo a multiplicação de bactérias benéficas (Sutili et al., 2018; Dawood et al., 2022). Também podem melhorar a síntese de enzimas digestivas e aumentam a absorção pela mucosa intestinal, como mostrado por Souza et al. (2019b) e de Souza et al. (2020). Estes autores avaliaram a adição dos OEs de *Ocimum*

basilicum e *A. triphylla*, respectivamente, na dieta de tilápia do Nilo, e foi observado que a inclusão do OE de *O. basilicum* promoveu maior produção da enzima amilase, e a adição da *A. triphylla* aumentou a síntese de lipase e protease alcalina. Já Copatti et al. (2022) avaliaram o OE de capim limão (*C. citratus*) na dieta do tambaqui e verificaram aumento na síntese da lipase intestinal com 1,0 e 1,5 mL kg⁻¹ dieta. Como resultado, os OEs podem aprimorar o desempenho zootécnico dos peixes, pois o efeito estimulante nas secreções intestinais influenciam a digestão e absorção de nutrientes e conseqüentemente fornecem maior arranjo de aminoácidos para síntese de proteínas, que poderão ser depositadas na musculatura dos animais (Sutili et al., 2018).

O aumento das vilosidades intestinais também já foi comprovado em peixes que receberam OEs na dieta, como em tilápia do Nilo alimentada com 250 mg kg⁻¹ do OE de *Malaleuca alternifolia* (Valladão et al., 2017). Da mesma forma, Mohamed et al. (2021) observaram aumento das vilosidades em tilápias que receberam OE de *Citrus sinensis* e *Citrus limon* na dieta. Valladão et al. (2017) e Mohamed et al. (2021) relataram que os OEs podem ter influenciado uma melhor digestão e absorção dos nutrientes pois vilosidades longas podem ser associadas a uma ótima saúde intestinal. Além disso, os OEs podem melhorar a palatabilidade da dieta devido, principalmente, aos componentes aromáticos (Valladão et al., 2017; de Souza et al., 2019a; Zhang et al., 2020).

Trabalhos com OEs que promoveram incremento no desempenho de peixes podem ser observados na Tabela 2. Shourbela et al. (2021) observaram maior desempenho zootécnico de tilápias do Nilo na densidade de estocagem de 2,3 kg m⁻³, com o emprego de 1 mL de OE de *Origanum vulgare* L. (orégano) na dieta. A utilização do OE de *Citrus sinensis* (casca da laranja doce) e *C. limon* (casca do limão) também se mostraram eficazes em promover aumento do desempenho em tilápias que receberam diferentes concentrações desses óleos. Os peixes deste estudo apresentaram maior ganho de peso, maior taxa de crescimento específico, além de melhora na taxa de conversão alimentar (Mohamed et al., 2021).

Tabela 2. Efeito dos óleos essenciais sobre o desempenho zootécnico de algumas espécies de peixes

Óleo essencial	Concentração	Período de alimentação	Espécie de peixe	Efeito sobre o desempenho	Referências
<i>Cymbopogon citratus</i>	200 e 400 mg kg ⁻¹	12 semanas	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑peso final; ↑GPD; ↑TCE; ↓taxa de conversão alimentar (TCA)	Al-Sagheer et al. (2018)
<i>Thymus vulgaris</i>	0,5 ml kg ⁻¹	2 meses	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↑ganho de peso; ↓TCA; ↑TCE.	Zargar et al. (2019)
<i>Lippia alba</i>	1, 2 ml kg ⁻¹	45 dias	<i>Oreochromis niloticus</i>	↓TCA; ↑TCE	De Souza et al. (2019 ^a)
<i>Ocimum basilicum</i> <i>Origanum vulgare</i>	0,5, 1, 2 ml kg ⁻¹	45 dias	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑peso final; ↑ganho de peso; ↓TCA; ↑TCE	De Souza et al. (2019 ^b)
	0, 5, 10, 15, 20 %	2 meses	<i>Cyprinus carpio</i>	↑peso final; ↑ganho de peso; ↑TCE;	Abdel-Latif et al. (2020a)
<i>Ocimum basilicum</i>	2 ml kg ⁻¹	48 dias	<i>Arapaima gigas</i>	↑ganho de peso; ↑TCE; ↓TCA	Chung et al. (2020)
<i>Aloysia triphylla</i>	1, 2 ml kg ⁻¹	45 dias	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ peso final; ↑TCE	de Souza et al. (2020)
<i>Origanum vulgare</i>	5 g kg ⁻¹	45 dias	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑Peso final; ↑Ganho de peso; ↓Conversão alimentar	de Oliveira et al. (2020)
<i>Citrus bergamia</i>	0,5%	8 semanas	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑Peso final; ↑TCA; ↑taxa de crescimento relativo; ↑TCE	Kesbiç et al. (2020)
<i>Petroselinum crispum</i>	1,0 e 2,0 ml kg ⁻¹	60 dias	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑Peso final; ↑Ganho de peso	Farag et al. (2021)

<i>Ocimum gratissimum</i>	1%	45 dias	<i>Pseudoplatystom a reticulatum</i>	↑Ganho de peso	Silva et al. (2021)
<i>Lippia sidoides</i>	0,5 ml kg ⁻¹	60 dias	<i>Colossoma macropomum</i>	↑Peso final; ↑ganho de peso; ↑TCE	Copatti et al. (2022a)
<i>Thymus vulgaris</i>	0,5, 1 e 2 % na dieta	60 dias	<i>Cyprinus carpio</i>	↑Peso final; ↓TCA; ↑ Taxa de sobrevivência após 60 dias de alimentação	Ghafariarsani et al. (2022)
<i>Satureja hortensis</i>	1%	21 dias	<i>Cyprinus carpio</i>	↑Peso final	Jalil et al. (2022)
<i>Tanacetum balsamita</i>	100 e 200 mg kg ⁻¹	8 semanas	<i>Cyprinus carpio</i>	↑Peso final; ↑Ganho de peso; ↑taxa de crescimento específico; ↓Conversão alimentar	Yousefi et al. (2023)

GPD: ganho de peso diário; TCA: taxa de conversão alimentar; TCE: taxa de crescimento específico.

Existem, no entanto, outros estudos que mostram efeito nulo ou negativo sobre o desempenho. Souza Silva et al. (2019) avaliaram os efeitos do OE de *Mentha piperita* na dieta de tilápia do Nilo e não observaram diferenças nos parâmetros de desempenho zootécnico dos peixes que receberam ração suplementada com o OE e o grupo controle. Chung et al. (2021b) observaram diminuição no ganho de peso e no crescimento específico de tambaquis que receberam maiores dosagens (1,0; 1,5 e 2,0 ml kg⁻¹) do OE de gengibre (*Z. officinale*) na dieta. Brum et al. (2017) observaram redução do peso e do crescimento específico em tilápias do Nilo, além do aumento da taxa de conversão alimentar no grupo que recebeu maiores concentrações (1,5%) do óleo de gengibre na dieta, atribuindo esse fato a possível toxicidade do OE em grandes concentrações. Monteiro et al. (2021) não observaram efeito sobre o desempenho de tambaquis que receberam o OE de gengibre (1,25 g kg⁻¹ e 5,0 g kg⁻¹) na dieta. Diferente dos trabalhos citados anteriormente, as concentrações utilizadas podem não ter sido suficientes para melhorar o desempenho ou causar toxidade no animal. Adicionalmente, o mesmo estudo mostrou que não houve efeito sobre o desempenho dos peixes com a inclusão dos tratamentos com OE de *L. sidoides* (0,625 g kg⁻¹ e 1,25 g kg⁻¹) e *O. gratissimum* (1,25 g kg⁻¹ e 5,0 g kg⁻¹) na dieta.

4. Hematologia, bioquímica e parâmetros imunológicos dos peixes

A hematologia e bioquímica sorológica são considerados marcadores importantes para se avaliar a saúde e bem-estar dos peixes (Fazio, 2019; de Souza et al., 2019a; Farag et al., 2021). Quando essas ferramentas são utilizadas em conjunto com os parâmetros imunológicos, é possível identificar o efeito dos OEs no sistema imune inato e na fisiologia dos peixes de forma geral (Vallejos-Vidal et al., 2017; Rodrigues et al., 2020). Por exemplo, o aumento da concentração de hemoglobina pode indicar um resultado positivo sobre a saúde dos peixes, pois é o componente responsável pelo transporte de oxigênio, mostrando um possível aumento no bem-estar dos animais (de Souza et al., 2019a; Chung et al., 2021b). Já o aumento em outros índices, como número total de leucócitos, pode indicar uma melhora nas respostas imunes celular (Brum et al., 2017; Ebrahimi et al., 2020; Silva et al., 2021), já que os leucócitos são os principais componentes celulares do sistema inato, sendo responsáveis pela destruição de patógenos e pela fagocitose (Zhu e Su, 2022). A diminuição dos valores, tanto do hematócrito, hemoglobina e eritrócitos, quanto dos índices hematimétricos, podem indicar efeitos indesejáveis ao animal, como a anemia ocasionada por infecções parasitárias (dos Santos et al., 2023), e/ou por bactérias (Thuong et al., 2022).

Efeitos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de algumas espécies de peixes

utilizando OEs na dieta também foram descritos (Tabela 3). O aumento nos índices de proteínas totais, albumina e globulina são também indicativos de melhora na resposta imune inata dos peixes. Além disso, as proteínas estão envolvidas em funções metabólicas do organismo: a albumina atua como antioxidante e a globulina atua como indicador em processos inflamatórios (Ghafarifarsani et al., 2022). Avaliar enzimas hepáticas também trazem informações relevantes, pois permitem verificar se há efeitos deletérios na saúde dos peixes. As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são bons indicadores de danos ao fígado, porque estão presentes principalmente nos hepatócitos e, quando há maiores concentrações na corrente sanguínea, podem indicar um possível efeito nocivo ao tecido hepático (Zargar et al., 2019; Chung et al., 2021a).

Para verificar o efeito dos óleos essenciais como imunoestimulantes, as análises mais utilizadas são os indicadores de atividade fagocitária, atividade respiratória dos leucócitos, atividade da lisozima e do sistema complemento (de Souza et al., 2019a; Zargar et al., 2019; Abdel-latif et al., 2020b; Priyadarsani et al., 2021). Isso é explicado pela utilização dos imunoestimulantes com a função de aumentar a regulação de parâmetros imunológicos (celulares e humorais), e de melhorar a resistência a patógenos comuns de peixes de produção (Vallejos-Vidal et al., 2017; Biller e Chagas, 2022).

A atividade respiratória dos leucócitos indica o efeito sobre a imunidade inata dos peixes. Ela é um importante mecanismo de defesa contra patógenos, e é ativada durante o processo de fagocitose, ao qual os leucócitos responsáveis por fagocitar microrganismos apresentam um maior consumo de oxigênio, conseqüentemente produzindo maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) como: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-). As EROs são tóxicas para os patógenos, levando-os à morte (Bulfon et al., 2018; Biller e Takahashi, 2018; Gupta et al., 2021b).

A lisozima e o sistema complemento são também importantes indicadores de imunidade inata humoral dos peixes. A lisozima está presente no soro e muco dos peixes, e possui atividade contra bactérias, danificando a parede celular bacteriana, atuando na ativação dos leucócitos e macrófagos ou promovendo a fagocitose de microrganismos (Diler et al., 2017; Ahmadifar et al., 2019). Já o sistema complemento pode eliminar corpos estranhos em conjunto com anticorpos ou sozinho, através da identificação, opsonização e lise do patógeno. A ativação do complemento permite aumentar as atividades fagocíticas. A administração de substâncias imunoestimulantes como os OES atuam na ativação desses indicadores, como lisozima e sistema complemento, melhorando as respostas imunes quando na presença de patógenos (Sakai et al., 2021; Vallejos-Vidal et al., 2017). Na Tabela 4 é possível observar o efeito

benéfico de diferentes óleos essenciais sobre os parâmetros imunológicos de diversas espécies de peixe.

Tabela 3. Efeito da suplementação de diferentes óleos essenciais sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos de peixes.

Óleo essencial	Espécie de peixe	Concentração	Dias de alimentação	Parâmetros hematológicos	Parâmetros bioquímicos	Referências
<i>Mentha piperita</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	0, 25%	50 dias	↑Leucócitos; ↑Trombócitos	↑Proteína plasmática	Souza Silva et al. (2019)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	1%	15 dias	↑Leucócitos	-	Valladão et al. (2019)
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Arapaima gigas</i>	2 ml kg ⁻¹	48 dias	-	↑Proteína totais; ↑Albumina	Chung et al. (2020)
<i>Zingiber officinale</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	1,5 e 2 ml kg ⁻¹	60 dias	↑Hb ↑Leucócitos; ↑Trombócitos	↑glicose; ↓albumina.	Chung et al. (2021b)
<i>Zingiber officinale</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	0,5, 1,5, 1 e 2 ml kg ⁻¹	60 dias	↑Hct; ↑Hb ↑Leucócitos; ↑Eritrócitos	↓Colesterol	Chung et al. (2021a)
<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	1,25 e 5,0 g kg ⁻¹	60 dias	↑Trombócitos	-	Monteiro et al. (2021)
<i>Lippia origanoides</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	0,125%	30 dias	↑ Eritrócitos; ↓HCM	-	Alves Jesus et al. (2021)
<i>Lippia sidoides</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	0,5, 1 e 1,5 ml kg ⁻¹	60 dias	↑Eritrócitos; ↑hemoglobina	↑ Albumina; ↑Glicose; ↑triglicerídeos	Copatti et al. (2022a)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	0,5, 1 e 2 %	60 dias	↑ Eritrócitos; ↑Hct; ↑Hb	↑Proteínas totais; ↑Albumina	Ghafariarsani et al. (2022)

<i>Origanum vulgare</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	2%	60 dias	↑Hb; ↑ Eritrócitos	-	Aly et al. (2022)
<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	200, 300 e 400 mg kg ⁻¹	20 dias	↑Hct; ↓Hb; ↑Eritrócitos; ↑Glóbulos brancos e trombóticos	-	Thuong et al. (2022)
<i>Mentha piperita</i>	<i>Oreochromis</i> sp.	0,5%	15 dias	↑Hb; ↑ Eritrócitos; ↑Glóbulos brancos e trombóticos	-	Vo et al., (2023)

Hct: hematócrito; Hb: concentração de hemoglobina

Tabela 4. Efeito dos diferentes óleos essenciais sobre os parâmetros imunológicos e sobrevivência dos peixes frente ao desafio com bactérias.

Óleo essencial	Espécie de peixe	Concentração testada	Dias de suplementação	Parâmetros imunológicos e sobrevivência	Referências
<i>Mentha piperita</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	250 mg kg ⁻¹	60 dias	↑Atividade do sistema complemento	Valladão et al. (2017)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	100 e 250 mg kg ⁻¹	60 dias	↑Atividade do sistema complemento	Valladão et al. (2017)
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	2 ml kg ⁻¹	21 dias	↑ a sobrevivência após infecção com <i>Aeromonas hydrophila</i> .	dos Santos et al. (2017)
<i>Lippia alba</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	2 ml kg ⁻¹	45 dias	↑Lisozima; maior sobrevivência dos peixes após desafio com <i>Aeromonas</i> spp.	de Souza et al. (2019a)
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	2 ml kg ⁻¹	45 dias	Aumentou a sobrevivência dos peixes após infecção com <i>A. hydrophila</i>	Souza et al. (2020)
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	5, 10, 15, 20 g kg ⁻¹	8 semanas	↑Lisozima sérica; ↑AF; ↑IF; Aumento da resistência após desafio bacteriano com <i>A. hydrophila</i>	Abdel-Latif et al. (2020b)

<i>Origanum vulgare</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	500, 1500 e 4500 mg kg ⁻¹	8 semanas	↑Lisozima; ↑ a sobrevivência após infecção com <i>Aeromonas hydrophila</i> .	Zhang et al. (2020)
<i>Eugenia spp</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	1,5% e 3%	4 semanas	↑AF; ↑Atividade respiratória de leucócitos; ↑Lisozima; ↑ a resistência ao desafio com <i>Streptococcus iniae</i>	Abdelkhalek et al. (2020)
<i>Lippia sidoides</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	0,625 e 1, 25 g kg ⁻¹	60 dias	↑Atividade respiratória dos leucócitos; Maior sobrevivência após infecção com <i>A. hydrophila</i>	Monteiro et al. (2021)
<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	1,5%	45 dias	↑Atividade Respiratória de Leucócitos; ↓ mortalidade após desafio com <i>A. hydrophila</i>	Silva et al. (2021)
<i>Lippia sidoides</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	0,5, 1,0 e 1,5 mL kg ⁻¹	60 dias	↑Lisozima	Copatti et al. (2022a)

<i>Satureja hortensis</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	1%	21 dias	↑Lisozima; ↑Sistema complemento	Jalil et al. (2022)
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	2%	60 dias	↑IF; ↑Lisozima após 60 dias e após desafio com <i>A. hydrophila</i>	Aly et al. (2022)
<i>Tanacetum balsamita</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	100 e 200 mg kg ⁻¹	8 semanas	↑Lisozima	Yousefi et al. (2023)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	1 e 2%	28 dias	↑Lisozima	Korni et al. (2023)
<i>Nigella sativa</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	1 e 2%	28 dias	↑Lisozima	Korni et al. (2023)
<i>Coriandrum sativum</i> L.	<i>Oreochromis niloticus</i>	1, 1,5 e 2%	60 dias	↑Atividade Respiratória de Leucócitos; ↑Lisozima; ↑ a resistência ao desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i>	Das et al. (2023)

AF: Atividade Fagocítica; IF: Índice Fagocítico

5. Considerações finais

A utilização de óleos essenciais na dieta animal vem ganhando destaque principalmente na piscicultura, ao qual é possível verificar os benefícios sobre as diferentes espécies de peixes. No entanto, é possível verificar as diferenças nas dosagens dos óleos aplicadas, sendo necessária busca de uma dose ideal (padrão) para cada espécie de peixe que possa influenciar positivamente na produção e não cause danos aos animais. Os diferentes componentes dos óleos, os locais de extração da planta, e as espécies de peixes influenciam na resposta final. Atualmente, estudos com os compostos isolados dos óleos essenciais também já vem ganhando destaque, mostrando que os estudos nessa área de produtos naturais e biodegradáveis é um passo importante para uma aquicultura mais sustentável.

A utilização de óleos essenciais como destacado pode ser benéfico para as mais diversas ocasiões, tanto para tratar doenças, intoxicações, como para melhorar o desempenho e imunidade dos peixes

Referências

- Abdelkhalek, N.K., Risha, E., El-Adl, M.A., Salama, M.F., Dawood, M.A.O., 2020. Antibacterial and antioxidant activity of clove oil against *Streptococcus iniae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effect on hepatic hepcidin expression. *Fish & Shellfish Immunology* 104, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.064>
- Abdel-Latif, H. M., Abdel-Tawwab, M., Khafaga, A. F., Dawood, M. A. 2020a. Dietary oregano essential oil improved the growth performance via enhancing the intestinal morphometry and hepato-renal functions of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Aquaculture* 526, 735432.
- Abdel-Latif, H.M.R., Abdel-Tawwab, M., Khafaga, A.F., Dawood, M.A.O., 2020b. Dietary organum essential oil improved antioxidative status, immune-related genes, and resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 104, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.056>
- 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.
- Al-Sagheer, A. A., Mahmoud, H. K., Reda, F. M., Mahgoub, S. A., & Ayyat, M. S. 2018. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquacult. Nutr.* 24(3), 1006-1014.
- Alves Jesus, G.F., Owatari, M.S., Pereira, S.A., Silva, B.C., Syracuse, N.M., Lopes, G.R., Addam, K., Cardoso, L., Pedreira Mouriño, J.L., Martins, M.L., 2021. Effects of sodium butyrate and *Lippia origanoides* essential oil blend on growth, intestinal microbiota, histology, and haemato-immunological response of Nile tilapia. *Fish & Shellfish Immunology* 117, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.008>
- Aly, S.M., Abdelrazek, H.M.A., Eidaroos, N.H., Mostafa, S.I., Marzouk, S.S., Nashaat, M., Farid, D.A., EIBanna, N.I. 2022. Effect of Oreganum (*Origanum vulgare* L.) essential oil on some immune parameters of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egypt. J. of Aquatic Biolo. and Fish.* 26, 63–79. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2022.270407>
- Barcellos, L.J.G., Manual de boas práticas na criação de peixes de cultivo. Brasília: MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) /SDI, 2022. Disponível em: https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/educacao-sanitaria/files/Manual_BP_cultivo_ISBN_ok2compressed-1.pdf
- Biller, J.D., Chagas, E.C., 2022. Mechanisms of resistance and tolerance against parasites in fish: the impairments caused by *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma macropomum*. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 94, e20210258. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220210258>
- Biller, J. D., Takahashi, L. S. 2018. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 90, 3403-3414.
- Brasil, E., Figueredo, A., Cardoso, L., Santos, M., Bertaglia, E., Furtado, W., Viana, J., Carmo, I., Chaves, F., Mouriño, J., Martins, M., 2019. *In vitro* and *in vivo* antiparasitic action of essential oils of *Lippia* spp. in Koi Carp (*Cyprinus carpio*) fed supplemented diets. *BJVP* 12, 88–100. <https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v12i3p88-100>
- Brud, W. S., 2020. Industrial uses of essential oils. In: *Handbook of Essential Oils*. CRC Press, 1029-1040.
- 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.

- Bulfon, C., Galeotti, M., Volpatti, D. 2018. Medicinal plant extracts modulate respiratory burst and proliferation activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes. *Fish Physiol. Biochem*, 44(1), 109-117.
- Chagas, E.C., Majolo, C., Monteiro, P.C., Oliveira, M.R.D., Gama, P.E., Bizzo, H.R., Chaves, F.C.M., 2020. Composition of essential oils of *Mentha* species and their antimicrobial activity against *Aeromonas* spp. *Journal of Essential Oil Research* 32, 209–215. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1741457>
- Chung, S., Lemos, C.H.D.P., Teixeira, D.V., Fortes-Silva, R., Copatti, C.E., 2020. Essential oil from *Ocimum basilicum* improves growth performance and does not alter biochemical variables related to stress in pirarucu (*Arapaima gigas*). *An. Acad. Bras. Ciênc.* 92, e20181374. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181374>
- Chung, S., Ribeiro, K., Teixeira, D. V., & Copatti, C. E. 2021a. Inclusion of essential oil from ginger in the diet improves physiological parameters of tambaqui juveniles (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture* 543, 736934
- Chung S., Ribeiro, K., Melo, J. F. B., Teixeira, D. V., Vidal, L. V. O., Copatti, C. E. 2021b. Essential oil from ginger influences the growth, haematological and biochemical variables and histomorphometry of intestine and liver of Nile tilapia juveniles. *Aquaculture* 534, 736325
- Copatti, C.E., Felix E Silva, A., Lorenzo, V.P., Melo, J.F.B., 2022a. Addition of essential oil from *Lippia sidoides* to the diet of tambaqui: An analysis of growth, metabolic and blood parameters, and intestinal enzymes. *Aquaculture* 560, 738482. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738482>
- Copatti, Carlos E., Felix e Silva, A., Lorenzo, V.P., da Costa, M.M., Melo, J.F.B., 2022b. Addition of essential oil from lemongrass to the tambaqui (*Colossoma macropomum*) diet: Effects on growth, intestinal enzymes, haematological and metabolic variables, and antimicrobial challenge. *Aquaculture Research* 53, 5656–5666. <https://doi.org/10.1111/are.16048>
- Cui, H., Zhang, C., Li, C., Lin, L., 2019. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crops and Products* 139, 111498. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111498>
- Cunha, J.A., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2018. The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens – a review. *J Appl Microbiol* 125, 328–344. <https://doi.org/10.1111/jam.13911>
- da Costa, O. T. F., Dias, L. C., Malmann, C. S. Y., de Lima Ferreira, C. A., do Carmo, I. B., Wischneski, A. G., de Sousa, R. L., Cavero, B. A. S., Lameiras, J. L. V., Dos-Santos, M. C. 2019. The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. *Aquaculture*, 499, 260-268.
- da Silva, A.M.S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., de Alexandre Sebastião, F., 2022. Prospecting of essential oils in combination with florfenicol against motile *Aeromonas* isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arch Microbiol* 204, 392. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03015-4>
- Das, S., Pradhan, C., Pillai, D., 2023. Dietary coriander (*Coriandrum sativum* L) oil improves antioxidant and anti-inflammatory activity, innate immune responses and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology* 132, 108486. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.108486>
- Dawood, M.A.O., El Basuini, M.F., Zaineldin, A.I., Yilmaz, S., Hasan, Md.T., Ahmadifar, E., El Asely, A.M., Abdel-Latif, H.M.R., Alagawany, M., Abu-Elala, N.M., Van Doan, H., Sewilam, H., 2021. Antiparasitic and Antibacterial Functionality of Essential Oils: An Alternative Approach for Sustainable Aquaculture. *Pathogens* 10, 185. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020185>
- Dawood, M.A.O., El Basuini, M.F., Yilmaz, S., Abdel-Latif, H.M.R., Alagawany, M., Kari, Z.A.,

- Abdul Razab, M.K.A., Hamid, N.K.A., Moonmanee, T., Van Doan, H., 2022. Exploring the Roles of Dietary Herbal Essential Oils in Aquaculture: A Review. *Animals* 12, 823. <https://doi.org/10.3390/ani12070823>
- de Oliveira, S.T.L., Soares, R.A.N., de Negreiros Sousa, S.M., Fernandes, A.W.C., Gouveia, G.V., da Costa, M.M., 2020. Natural products as functional food ingredients for Nile tilapia challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Aquacult Int* 28, 913–926. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00503-1>.
- de Souza, R. C., Baldisserotto, B., Melo, J. F. B., da Costa, M. M., de Souza, E. M., Copatti, C. E. 2020. Dietary *Aloysia triphylla* essential oil on growth performance and biochemical and haematological variables in Nile tilapia. *Aquaculture* 519, 734913.
- de Souza, R. C., De Souza, E. M., Da Costa, M. M., Melo, J. F. B., Baldisserotto, B., Copatti, C. E., 2019a. Dietary addition of the essential oil from *Lippia alba* to Nile tilapia and its effect after inoculation with *Aeromonas* spp. *Aquac Nutr.* 25 (1), 39-45.
- de Souza, E. M., De Souza, R. C., Melo, J. F., Da Costa, M. M., De Souza, A. M., Copatti, C. E., 2019b. Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in Nile tilapia diet: Growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. *Aquaculture* 504, 7-12.
- Deekshit, V.K., Maiti, B., Krishna Kumar, B., Kotian, A., Pinto, G., Bondad-Reantaso, M.G., Karunasagar, Iddya, Karunasagar, Indrani, 2023. Antimicrobial resistance in fish pathogens and alternative risk mitigation strategies. *Reviews in Aquaculture* 15, 261–273. <https://doi.org/10.1111/raq.12715>
- Diler, O., Gormez, O., Diler, I., Metin, S. E. Ç. İ. L. 2017. Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult. Nutr.* 23(4), 844-851.
- 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 Immunology* 62, 213–216. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.032>
- dos Santos, P.R., De Andrade Porto, S.M., Brandão, F.R., De Melo Souza, D.C., Rocha, M.J.S., De Alexandre Sebastião, F., Oliveira, M.R., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., 2023. Efficacy of the essential oils of *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* and *Piper aduncum* in the control of *Piscinoodinium pillulare* (Shaperclaus, 1954) in *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture* 565, 739127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739127>
- Ebrahimi, E., Haghjou, M., Nematollahi, A., Goudarzian, F. 2020. Effects of rosemary essential oil on growth performance and hematological parameters of young great sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture* 521, 734909.
- Edeh, I.C., Nsofor, C.I., 2023. Utilization of antibiotics in aquaculture; present status and future alternatives in the post covid-19 pandemic era: *The Bioscientist Journal* 11, 57–70.
- Elumalai, P., Kurian, A., Lakshmi, S., Faggio, C., Esteban, M. A., Ringø, E., 2020. Herbal immunomodulators in aquaculture. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 29 (1), 33-57.
- Farag, M.R., Mahmoud, H.K., El-Sayed, S.A.A., Ahmed, S.Y.A., Alagawany, M., Abou-Zeid, S.M., 2021. Neurobehavioral, physiological and inflammatory impairments in response to bifenthrin intoxication in *Oreochromis niloticus* fish: Role of dietary supplementation with *Petroselinum crispum* essential oil. *Aquatic Toxicology* 231, 105715. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105715>
- Fazio, F. 2019. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture* 500, 237 – 242.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2020 - Sustainability in action. Roma: FAO, 2020.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. The state of world fisheries and

- aquaculture 2022. *Towards Blue Transformation*. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Gabriel, N. N., 2019. Review on the progress in the role of herbal extracts in tilapia culture. *Cogent food agric.* 5, 1619651.
- García-Márquez, J., Barany, A., Ruiz, Á.B., Costas, B., Arijo, S., Mancera, J.M., 2021. Antimicrobial and Toxic Activity of Citronella Essential Oil (*Cymbopogon nardus*), and Its Effect on the Growth and Metabolism of Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). *Fishes* 6, 61. <https://doi.org/10.3390/fishes6040061>
- Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S.H., Sheikhlari, A., Raissy, M., Chaharmahali, F.H., Maneepitaksanti, W., Faheem, M., Van Doan, H., 2022. The Effects of Dietary Thyme Oil (*Thymus vulgaris*) Essential Oils for Common Carp (*Cyprinus carpio*): Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, Antioxidant Defense, Tissue and Mucus Immune Parameters, and Resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Nutrition* 2022, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2022/7942506>
- Gonzales, A.P.P.F., Yoshioka, E.T.O., Mathews, P.D., Mertins, O., Chaves, F.C.M., Videira, M.N., Tavares-Dias, M., 2020. Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. *Aquaculture* 528, 735500. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735500>
- Gupta, A., Gupta, S. K., Priyam, M., Siddik, M. A., Kumar, N., Mishra, P. K., Gupta, K. K., Sarkar, B., Sharma, T. R., Pattanayak, A., 2021b. Immunomodulation by dietary supplements: A preventive health strategy for sustainable aquaculture of tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Rev Aquacult.*
- Gupta, N., Rani Kar, S., Chakraborty, A. 2021a. A Review on Medicinal Plants and Immune Status of Fish. *Egypt. J. Aquat. Biol. Fish.*, 25(2), 897-912.
- Harris, B. 2020. Phytotherapeutic Uses of Essential Oils. In: *Handbook of Essential Oils*. CRC Press, 1029-1040.
- Hassoun, A., Çoban, Ö. E., 2017. Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. *Trends Food Sci. Technol.* 68, 26-36.
- Hilsdorf, A.W.S., Hallerman, E., Valladão, G.M.R., Zaminhan-Hassemer, M., Hashimoto, D.T., Dairiki, J.K., Takahashi, L.S., Albergaria, F.C., Gomes, M.E. de S., Venturieri, R.L.L., Moreira, R.G., Cyrino, J.E.P., 2022. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. *Reviews in Aquaculture* 14, 993–1027. <https://doi.org/10.1111/raq.12638>
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA – IBGE. Pesquisa da pecuária municipal 2020. Rio de Janeiro. IBGE, 2020. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>>.
- Jalil, A.T., Abdelbasset, W.K., Shichiyakh, R.A., Widjaja, G., Altimari, U.S., Aravindhan, S., Thijail, H.A., Mustafa, Y.F., Naserabad, S.S., 2022. Protective effects of summer savory (*Satureja hortensis*) oil on growth, biochemical, and immune system performance of common carp exposed to pretilachlor herbicide. *Vet Res Commun* 46, 1063–1074. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09970-z>
- Jugreet, B. S., Suroowan, S., Rengasamy, R. R. K., Mahomoodally, M. F., 2020. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. *Trends Food Sci. Technol.*, 101, 89-105.
- Kesbiç, O.S., Acar, Ü., Yilmaz, S., Aydin, Ö.D., 2020. Effects of bergamot (*Citrus bergamia*) peel oil-supplemented diets on growth performance, haematology and serum biochemical parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiol Biochem* 46, 103–110. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00700-y>

- Korni, F.M.M., Mohammed, A.N., Moawad, U.K., 2023. Using some natural essential oils and their nano-emulsions for ammonia management, anti-stress and prevention of streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquacult Int*. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01076-w>
- Liang, C., Huang, S., Geng, Y., Huang, X., Chen, D., Lai, W., Guo, H., Deng, H., Fang, J., Yin, L., Ouyang, P., 2022. A Study on the antibacterial mechanism of thymol against *Aeromonas hydrophila* in vitro. *Aquacult Int* 30, 115–129. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00789-0>
- Li, L., Shen, Y., Yang, W., Xu, X., Li, J., 2021. Effect of different stocking densities on fish growth performance: A meta-analysis. *Aquaculture* 544, 737152. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737152>
- Madhupriya, V., Shamsudeen, P., Manohar, G. R., Senthilkumar, S., Soundarapandiyam, V., Moorthy, M., 2018. Phyto feed additives in poultry nutrition-a review. *Int. j. sci. environ. technol.*, 7, 815-822.
- Masyita, A., Mustika Sari, R., Dwi Astuti, A., Yasir, B., Rahma Rumata, N., Emran, T.B., Nainu, F., Simal-Gandara, J., 2022. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X* 13, 100217. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>
- Miura, P.T., Jonsson, C.M., Queiroz, S.C.D.N.D., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Reyes, F.G.R., 2021. Ecological risk assessment of *Piper aduncum* essential oil in non-target organisms. *Acta Amaz.* 51, 71–78. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202002691>
- Mohamed, R. A., Yousef, Y. M., El-Tras, W. F., Khalafallaa, M. M. 2021. Dietary essential oil extract from sweet orange (*Citrus sinensis*) and bitter lemon (*Citrus limon*) peels improved Nile tilapia performance and health status. *Aquacult. Res.*, 52(4), 1463-1479.
- Monteiro, P. C., Brandão, F. R., Farias, C. F. S., de Alexandre Sebastião, F., Majolo, C., Dairiki, J. K., De Oliveira, M. R., Chaves, F. C. M., O'Sullivan, F. L. A., Martins, M. L., Chagas, E. C. 2021. Dietary supplementation with essential oils of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* on the growth and hemato-immunological parameters of *Colossoma macropomum* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Aquacult. Rep.*, 19, 100561.
- Mucha, W., Witkowska, D., 2021. The Applicability of Essential Oils in Different Stages of Production of Animal-Based Foods. *Molecules* 26, 3798. <https://doi.org/10.3390/molecules26133798>
- Oliveira, M.I B., Brandão, F.R., da Silva, M.J.R., Rosa, M.C., Farias, C.F.S., dos Santos, D.S., Majolo, C., Oliveira, M.R.D., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.R., Tavares-Dias, M., Chagas, E.C., 2021. *In vitro* anthelmintic efficacy of essential oils in the control of *Neoechinorhynchus buttnerae*, an endoparasite of *Colossoma macropomum*. *Journal of Essential Oil Research* 33, 509–522. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1921065>
- Priyadarsani, L., Abraham, T. J., Adikesavalu, H., Dash, G., Nagesh, T. S. 2021. Effects of dietary supplementation of vitamin-E and commercial probiotics on the innate immunity of *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 100013.
- Ribeiro, S.C., Malheiros, D.F., Guillozki, 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>
- Rodrigues, F. S., Chagas, S. R., Rocha, M. C. V., de Paula Nascente, E., Paula, F. G., Pascoal, L. M. 2020. Sistema imune inato de peixes e o uso do alho como imunoestimulante: revisão de literatura. *Res., Soc. Dev.* 9(4), e152943014-e152943014.
- Sakai, M., Hikima, J. I., Kono, T. 2021. Fish cytokines: Current research and applications. *Fish. Sci.*, 87(1), 1-9.
- Schmidt, E., 2020. Production of essential oils. In: *Handbook of essential oils*. CRC Press, 125-160.
- Shourbela, R. M., El-Hawarry, W. N., Elfadadny, M. R., Dawood, M. A. 2021. Oregano essential oil enhanced the growth performance, immunity, and antioxidative status of Nile tilapia

- (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems. *Aquaculture* 542, 736868.
- Silva, J. M. D., Paz, A. D. L., Val, A. L. 2021. Effect of carvacrol on the haemato-immunological parameters, growth and resistance of *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) infected by *Aeromonas hydrophila*. *Aquacult. Res.*, 52(7), 3291-3300.
- Silva, L.A.D., Pilarski, F., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Fernandes, C.E., Libanori, M.C.M., Pereira, S.A., Martins, M.L., Campos, C.M.D. 2021. *Ocimum gratissimum* essential oil improved the health, innate immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Semina: Ciênc. Agrár.* 42, 3855–3868. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n6Supl2p3855>
- Singh, J., Gaikwad, D. S., 2020. Phyto-genic feed additives in animal nutrition, in: Singh, J, Yadav, A. N (Eds.), *Natural bioactive products in sustainable agriculture*, 273-289.
- Souza, E.M.D., Souza, R.C.D., Melo, J.F.B., Costa, M.M.D., Souza, S. a. D., Souza, A.M.D., Copatti, C.E., 2020. *Cymbopogon flexuosus* essential oil as an additive improves growth, biochemical and physiological responses and survival against *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 92, e20190140. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020190140>
- Souza Silva, L. T., de Pádua Pereira, U., 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
- Stevanović, Z. D., Bošnjak-Neumüller, J., Pajić-Lijaković, I., Raj, J., Vasiljević, M., 2018. Essential oils as feed additives – Future perspectives. *Molecules* 23, 1 – 20. <https://doi.org/10.3390/molecules23071717>
- Stratev, D., Zhelyazkov, G., Noundou, X.S., Krause, R.W.M., 2018. Beneficial effects of medicinal plants in fish diseases. *Aquacult Int* 26, 289–308. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0219-x>
- Sutili, F. J., Gatlin III, D. M., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., 2018. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Rev Aquacult.*, 10, 716-726.
- Tavares-Dias, M. 2018. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquat. Living Resour.*, 31, 13.
- Thuong, H.N.T., Tran, T.-L.-N., Le, T.-N.-T., Vo, V.-T., 2022. Hematological parameters of red tilapia (*Oreochromis* sp.) fed lemongrass essential oil (*Cymbopogon citratus*) after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 74. <https://doi.org/10.46989/001c.57781>
- Valenti, W.C., Barros, H.P., Moraes-Valenti, P., Bueno, G.W., Cavalli, R.O., 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports* 19, 100611. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Kotzent, S., Assane, I. M., Pilarski, F. 2019. Effects of dietary thyme essential oil on hemato-immunological indices, intestinal morphology, and microbiota of Nile tilapia. *Aquacult. Int.*, 27(2), 399-411.
- Valladao, G. M., 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. *Aquacult. Res.*, 48(11), 5640-5649.
- Vallejos-Vidal, E., Reyes-López, F., MacKenzie, S., 2017. Immunostimulant Diets and Oral Vaccination In Fish, in: Austin, B., Newaj-Fyzul, A. (Eds.), *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 147–184. <https://doi.org/10.1002/9781119152125.ch6>
- Vo, V.T., Tran, T.H., Nguyen, T.T.T., Truong, V.T., Pham, C.T., Pham, T.M., Thuong, H.N.T., 2023. Hematological Parameters of Red Tilapia (*Oreochromis* sp.) Fed Essential Oils of *Mentha piperita* after Challenge with *Streptococcus agalactiae*. *PJZ* 55. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20211106031127>

- Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J.G., Hu, F., Wei, Z.J., 2020. Antibacterial Activity and Mechanism of Ginger Essential Oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 25, 3955. <https://doi.org/10.3390/molecules25173955>
- Yousefi, M., Adineh, H., Sedaghat, Z., Yilmaz, S., Elgabry, S.E., 2023. Effects of dietary costmary (*Tanacetum balsamita*) essential oil on growth performance, digestive enzymes' activity, immune responses and subjected to ambient ammonia of common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 569, 739347. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739347>
- Zargar, A., Rahimi-Afzal, Z., Soltani, E., Taheri Mirghaed, A., Ebrahimzadeh-Mousavi, H. A., Soltani, M., Yuosefi, P. 2019. Growth performance, immune response and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed *Thymus vulgaris* essential oils. *Aquacult. Res.*, 50(11), 3097-3106.
- Zhang, R., Wang, X. W., Liu, L. L., Cao, Y. C., & Zhu, H. 2020. Dietary oregano essential oil improved the immune response, activity of digestive enzymes, and intestinal microbiota of the koi carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 518, 7347.
- Zhang, W., Zhao, J., Ma, Y., Li, J., Chen, X., 2022. The effective components of herbal medicines used for prevention and control of fish diseases. *Fish & Shellfish Immunology* 126, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.05.036>
- Zhu, F., 2020. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture* 526, 735422. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735422>
- Zhu, W., Su, J., 2022. Immune functions of phagocytic blood cells in teleost. *Reviews in Aquaculture* 14, 630–646. <https://doi.org/10.1111/raq.12616>

Capítulo 2

Óleos essenciais de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* na dieta de tambaqui (*Colossoma macropomum*): efeito sobre parâmetros zootécnicos, hemato-imunológicos e resistência frente ao estímulo com *Aeromonas jandaei*

Artigo elaborado conforme as normas da Aquaculture

Óleos essenciais de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* na dieta de tambaqui (*Colossoma macropomum*): efeito sobre parâmetros zootécnicos, hemato-imunológicos e resistência frente ao estímulo com *Aeromonas jandaei*

Kamila Raissa de Souza Barbosa^a; Fernanda de Alexandre Sebastião^{a,b}; Luana Rubim Fernandes^a; Rayza Lima Araújo^{a,c}; Damy Caroline de Melo e Souza^d; Marcelo Róseo de Oliveira^b; Francisco Célio Maia Chaves^b; Edsandra Campos Chagas^{a,b}

^aPrograma de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros - PPGCARP, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, Brasil.

^bEmbrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil.

^cInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM, Presidente Figueiredo, AM, Brasil.

^dPrograma de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGGIBA, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, Brasil.

Resumo

A busca por aditivos naturais com características imunoestimulantes na aquicultura vem aumentando. Um exemplo são alguns óleos essenciais (OEs) que melhoram as respostas imunes dos peixes contra doenças e ajudam a reduzir a utilização de antibióticos. Para os OEs de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* já é comprovada atividade antimicrobiana *in vitro* sobre bactérias do gênero *Aeromonas*. Assim, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o efeito da inclusão dos OEs de *L. gracilis* e *C. citratus* na dieta de tambaqui (*Colossoma macropomum*) sobre o crescimento, respostas hemato-imunológicas antes e após inoculação de 10^8 UFC/mL de *Aeromonas jandaei*. Foram utilizados 5 tratamentos (T1= 0,0 g kg⁻¹; T2= 5,0 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis*; T3= 10,0 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis*; T4= 5,0 g kg⁻¹ de OE de *C. citratus*; T5= 10,0 g kg⁻¹ de OE de *C. citratus*) com 4 repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Os OEs foram adicionados à ração comercial (32% PB), fornecida aos peixes (n=240) duas vezes por dia, durante 60 dias. Em seguida, foram realizadas biometria e coleta sanguínea dos peixes para análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas. Para os dados paramétricos foi aplicado a análise de variância (one-way) e para os dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal Wallis. Com relação aos parâmetros avaliados, não foi encontrada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) nos valores de desempenho zootécnico, nos índices hematológicos (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, hemoglobina corpuscular média,

volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média), nos parâmetros bioquímicos (proteínas totais, albumina e globulina) e nos parâmetros imunológicos, como atividade respiratória de leucócitos e concentração de lisozima entre os tratamentos com OEs após 60 dias de alimentação. Entretanto, observou-se uma redução significativa nos valores de aspartato aminotransferase (AST) no tratamento contendo 5 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis* em relação aos demais tratamentos. Foi inoculada a bactéria *A. jandaei* nos peixes de todos os tratamentos, sem mortalidades no período de 15 dias. Todavia, observou-se alterações em alguns parâmetros sanguíneos 10 dias após a estimulação com a bactéria: o tratamento controle apresentou redução significativa nos valores de volume corpuscular médio (VCM) em relação ao tratamento com 5 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis*, e os valores de proteínas totais dos peixes pertencentes aos tratamentos controle e 10 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis* foram significativamente menores em relação ao tratamento com 5 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis*. Portanto, a inclusão dos óleos essenciais de *L. gracilis* e *C. citratus* mostrou efeitos não-deletérios à saúde dos peixes, uma vez que os mesmos não afetaram negativamente o desempenho zootécnico dos peixes, nem a taxa de sobrevivência, mesmo após inoculação de *A. jandaei*.

Palavras chaves: *Aeromonas jandaei*, *Colossoma macropomum*, imunoestimulante, óleos essenciais.

Abstract

The search for natural additives with immunostimulating characteristics in aquaculture has been increasing. An example is some essential oils (OEs) that improve the immune responses of fish against diseases and help to reduce the use of antibiotics. For *Lippia gracilis* and *Cymbopogon citratus* OEs *in vitro* antimicrobial activity against bacteria of the genus *Aeromonas* has already been proven. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of including EOs from *L. gracilis* and *C. citratus* in the diet of tambaqui (*Colossoma macropomum*) on growth, hemato-immunological responses before and after inoculation of 10⁸ CFU/mL of *Aeromonas jandaei*. Five treatments were used (T1= 0.0 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO; T2= 5.0 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO; T3= 10.0 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO; T4= 5.0 g kg⁻¹ of *C. citratus* EO; T5= 10.0 g kg⁻¹ of *C. citratus* EO) with 4 replications, in a completely randomized design. The EOs were added to the commercial feed (32% CP), given to the fish (n=240) twice a day, for 60 days. Then, biometry and blood collection of the fish were performed for hematological, biochemical and immunological analyses. For parametric data, analysis of variance (one-way) was applied and for non-parametric data, the Kruskal Wallis test was applied. Regarding the evaluated parameters, no statistically significant difference (p<0.05) was found in the zootechnical

performance values, in the hematological indices (hematocrit, hemoglobin, erythrocytes, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration), on biochemical parameters (total proteins, albumin and globulin) and on immunological parameters such as respiratory activity of leukocytes and lysozyme concentration between treatments with EOs after 60 days of feeding. However, a significant reduction in aspartate aminotransferase (AST) values was observed in the treatment containing 5 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO compared to the other treatments. The bacteria *A. jandaei* was inoculated in the fish of all treatments, without mortalities in the period of 15 days. However, changes were observed in some blood parameters 10 days after stimulation with the bacteria: the control treatment showed a significant reduction in mean corpuscular volume (MCV) values in relation to the treatment with 5 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO, and the total protein values of fish belonging to the control treatments and 10 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO were significantly lower in relation to the treatment with 5 g kg⁻¹ of *L. gracilis* EO. Therefore, the inclusion of essential oils from *L. gracilis* and *C. citratus* showed non-deleterious effects on the health of the fish, since they did not negatively affect the zootechnical performance of the fish, nor the survival rate, even after inoculation of *A. jandaei*.

Keywords: *Aeromonas jandaei*, *Colossoma macropomum*, immunostimulant, essential oil.

1. Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a espécie de peixe nativa mais produzida no Brasil com 94 mil toneladas, e a região Norte é detentora de 71% da produção total (IBGE, 2021). Essa espécie apresenta características desejáveis para a criação, como rápido crescimento, disponibilidade de alevinos ao longo do ano, tolerância a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água, boa aceitação pelos consumidores, alto valor nutricional de sua carne, entre outros (Hilsdorf et al., 2022). Entretanto, as doenças bacterianas, como as causadas por bactérias do gênero *Aeromonas*, representam um entrave na criação do tambaqui (Gallani et al., 2020; Mielke et al., 2022). Neste contexto, a busca por novos produtos que possam atuar como imunoestimulante torna-se primordial, de forma a contribuir para melhorar as condições de saúde dos peixes, influenciando positivamente na produção da aquicultura.

A utilização de aditivos alimentares como imunoestimulantes tem se tornado uma opção viável para a melhoria na produção de peixes (Abarike et al., 2019). Essas substâncias servem para aumentar a resistência dos animais às mais variadas doenças, sejam elas bacterianas, virais

ou fúngicas, devido ativação dos mecanismos de defesa (Awad e Awaad, 2017). Diversos compostos considerados seguros ecologicamente e que atuam melhorando as respostas imunológicas estão sendo estudados (Almarri et al., 2023). Dentre os aditivos mais utilizados, encontram-se aqueles obtidos de plantas, como os óleos essenciais e extratos vegetais. O uso de produtos naturais com características imunoestimulante na piscicultura tem como objetivo tornar a produção mais sustentável (Abarike et al., 2019), principalmente pela redução da utilização produtos sintéticos para o controle de doenças, como os antibióticos (Limbu et al., 2021; Edeh et al., 2023).

Além disso, estudos com óleos essenciais como aditivos imunoestimulantes mostram efeitos benéficos sobre a saúde e o desempenho zootécnico em algumas espécies de peixes, como observado com os OE de gengibre (*Zingiber officinale*) que aumentou o número de leucocitos, hemoglobina e trombócitos em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Chung et al., 2021) e *Ocimum basilicum* que promoveu aumento no ganho de peso, peso final, taxa de crescimento específico, assim como na atividade da lisozima após infecção com *Aeromonas hydrophila* (de Souza et al., 2019) também em tilápia do Nilo. Em tambaquís, o uso de *Lippia sidoides* promoveu aumento da atividade respiratória de leucocitos após desafio com *A. hydrophila* (Monteiro et al., 2021) e aumento da lisozima (Copatti et al., 2022a), enquanto que o OE de *Cymbopogon citratus* aumentou o ganho de peso, proteínas totais e sobrevivência após desafio com *A. hydrophila* (Copatti et al., 2022b). Em tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachyomus*) o OE de *Lippia grata* promoveu aumento do desempenho zootécnico dos peixes (Costa et al., 2022).

Dentre as várias espécies de plantas estudadas, *L. gracilis* e *C. citratus* se destacam como promissoras para uso na criação de peixes. A espécie *L. gracilis* (Verbenaceae) é conhecida como alecrim da chapada, ocorre em diversos países. No Brasil, é nativa da caatinga na região nordeste, mas pode ser encontrada também na região norte (dos Santos et al., 2019). Já a espécie *C. citratus*, pertencente à família Poaceae, é conhecida como capim limão ou capim santo, e se desenvolve principalmente em regiões tropicais e subtropicais (da Silva et al., 2020). Os OEs de ambas as espécies apresentam características imunoestimulantes para a tilápia do Nilo (Al Sagheer et al., 2018), anti-helmínticas para tambaqui (Gonzales et al., 2020; Oliveira et al., 2021) e antimicrobianas (Cardoso-Junior et al., 2021; da Silva et al., 2022). Com relação à esta última característica, o efeito foi relatado em experimentos *in vitro* com bactérias de potencial patogênico para peixes, como as do gênero *Aeromonas* (da Silva et al., 2022; Felix e Silva et al., 2022).

Estudos recentes mostram que as bactérias *A. jandaei* e *A. hydrophilla* podem ser

patogênicas para o tambaqui, sendo relatados algumas alterações comportamentais e sinais clínicos decorrentes desta infecção, como natação errática, letargia, escurecimento da pele, lesões ulcerativas, além de hemorragia e mortalidade (Gallani et al., 2020; Mielke et al., 2022). As duas bactérias causaram infecção aguda associada a septicemia por *Aeromonas* móveis (SAM) no tambaqui (Gallani et al., 2020; Mielke et al., 2022), e essa é uma doença de grande relevância na aquicultura, por causar perdas bilionárias na produção de peixes (Dien et al., 2023).

Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inclusão dos óleos essenciais de *L. gracilis* e *C. citratus* na dieta do tambaqui (*C. macropomum*) sobre o crescimento, respostas hemato-imunológicas antes e após estímulo com *A. jandaei*.

2. Material e métodos

2.1 Animais

Os juvenis de tambaqui ($57,1 \pm 0,8$ g; $15,0 \pm 0,07$ cm) foram adquiridos em uma fazenda localizada no município de Rio Preto da Eva (estado do Amazonas, Brasil) e transferidos para o setor de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, Amazonas, Brasil). Lá foram acondicionados e aclimatados em caixas de água de 1000 L, com aeração constante, sistema de recirculação e aquecimento de água. Os peixes foram alimentados com ração comercial (MULTIFÓS, 32% proteína bruta, pellet - 4 mm) até a saciedade aparente, duas vezes ao dia.

Durante o período de aclimação os parâmetros da qualidade de água foram mensurados diariamente, cujos valores foram: oxigênio dissolvido ($7,27 \pm 0,02$ mg L⁻¹) e temperatura ($29,2 \pm 0,03$ °C) com auxílio de oxímetro digital (mYSI Pro20, YSI Inc., USA), pH ($6,89 \pm 0,04$) com uso de pHmetro digital (YSI F-1100, YSI Inc., 50 USA), alcalinidade ($3,9 \pm 0,14$ mg L⁻¹) e dureza ($15,8 \pm 2,7$ mg L⁻¹) calculados por titulação, e amônia ($0,5 \pm 0,1$ mg L⁻¹) total determinada pelo método de endofenol, de acordo com APHA (1998).

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental, sob o protocolo N° 03/2022.

2.2 Óleos essenciais

Os OEs de *L. gracilis* e *C. citratus* foram obtidos pelo processo de hidrodestilação, com o auxílio do aparelho tipo Clevenger. O material vegetal empregado na extração foram as folhas obtidas de plantas adultas cultivadas no setor de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, Amazonas). Amostras desses OEs foram utilizadas para caracterização de

sua composição química por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Os principais componentes identificados foram carvacrol (42,2%), *p*-cimeno (11,2%) e γ -terpineno (10,7%) no OE de *L. gracilis*, e geranial (45,7%), neral (33,9%) e mirceno (6,6%) no OE de *C. citratus*, conforme descrito por da Silva et al. (2022).

2.3 Dietas experimentais

Durante o período experimental, os peixes foram alimentados com as dietas-teste que consistiram de ração comercial (32% PB) com incorporação de OEs através do processo de revestimento com polímero etilcelulose, para evitar lixiviação do óleo essencial para água (Cordeiro et al., 2022). Em resumo, para cada quilograma de ração, os OEs e a etilcelulose (concentração de 0,75%) foram diluídos em 100 mL de álcool. Em seguida, as soluções foram aspergidas na dieta. No tratamento controle foram aspergidos somente a solução de etilcelulose. As dietas-teste foram secas a 25° C por 24 h, embaladas e mantidas sob refrigeração (4°C). Posteriormente foram fornecidas duas vezes ao dia, com base na biomassa (3% do peso vivo), durante 60 dias.

2.4 Desenho experimental

Juvenis de tambaqui ($n = 240$, $57,1 \pm 0,8$ g; $15,0 \pm 0,07$ cm) foram distribuídos aleatoriamente em 20 tanques de 1000 L ($n = 12$ por tanque), compondo cinco tratamentos, com quatro repetições. Os tratamentos consistiram em: T1 = 0 g kg⁻¹ (controle); T2 = 5,0 g kg⁻¹ do OE de *L. gracilis* na dieta; T3 = 10,0 g kg⁻¹ do OE de *L. gracilis* na dieta; T4 = 5,0 g kg⁻¹ do OE de *C. citratus* na dieta; T5 = 10,0 g kg⁻¹ do OE de *C. citratus* na dieta. As concentrações dos OEs seguiram recomendação de Monteiro et al. (2021) e da Silva et al. (2022).

Os peixes foram alimentados com base na biomassa estocada (3% do peso vivo dia⁻¹), duas vezes ao dia (8 a.m. e 4 p.m.), durante 60 dias. Após esse período, os peixes passaram pelo procedimento de biometria e coleta de sangue para determinação dos parâmetros zootécnicos, hematológicos, bioquímicos e imunológicos. Após 60 dias de alimentação, os peixes foram inoculados com *A. jandaei* (10⁸ UFC mL⁻¹) e a mortalidade foi acompanhada por um período de 15 dias.

Durante o período experimental os valores registrados para os parâmetros da qualidade de água foram: oxigênio dissolvido ($6,99 \pm 0,40$ mg L⁻¹), temperatura ($30,0 \pm 0,44$ °C), pH ($5,55 \pm 0,14$), alcalinidade ($3,6 \pm 0,31$ mg L⁻¹), dureza ($27,4 \pm 2,1$ mg L⁻¹) e amônia ($0,9 \pm 0,06$ mg L⁻¹)

2.5 Parâmetro de desempenho

Após 60 dias de alimentação, os parâmetros de desempenho zootécnico de *C. macropomum* foram calculados de acordo com Costa et al. (2022), a saber: peso inicial PI (g); peso final PF (g); comprimento final CF (cm); ganho de peso total GP (g) = peso final - peso inicial; conversão alimentar (CA) = consumo de ração/ganho de peso; fator de condição FC = $100 * (\text{peso final}) / (\text{comprimento final})^3$; taxa de crescimento específico (%) = $(\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})) / \text{dias de alimentação} * 100$; sobrevivência S (%) = $(\text{número final de peixes} / \text{número inicial de peixes}) * 100$.

2.6 Coleta sanguínea, análises hematológicas e bioquímicas

As coletas sanguíneas foram realizadas ao final dos 60 dias de alimentação e após 10 dias da inoculação bacteriana. Para isso, os peixes (n=12 por tratamento) foram anestesiados com 100 mg L⁻¹ de benzocaína (Gomes et al., 2001) e o sangue (cerca de 1,5 mL) foi coletado por punção da veia caudal, utilizando seringas estéreis. Metade do sangue coletado foi armazenado em microtubos de 2 mL contendo anticoagulante (heparina – 100 µL) para realização das análises hematológicas. A outra parte do sangue foi adicionada em microtubos sem heparina, para a obtenção de soro a fim de se realizar as análises bioquímicas, enzimáticas e imunológicas. As análises hematológicas realizadas foram: hematócrito (Hct, %), pela centrifugação do sangue em tubos capilares e leitura em escala padronizada; hemoglobina (Hb, g dL⁻¹) determinada pelo método da ciano-metahemoglobina segundo Collier (1944); e a contagem de eritrócitos (RBC, 10⁶ células µL⁻¹), realizada em câmara de Neubauer após diluição do sangue em solução de formol citrato (Natt e Herrick, 1952). As constantes corpusculares determinadas foram: volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg) e concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM, %), segundo Ranzani-Paiva et al. (2013). Quanto aos parâmetros bioquímicos, foram determinados os níveis de proteínas totais (g dL⁻¹) pelo método de biureto e, albumina (g dL⁻¹) pelo método de verde de bromocresol, utilizando-se kits comerciais (Labtest[®]) em ambos os casos. Já a globulina foi determinada pela seguinte fórmula: globulina = proteínas totais – albumina. A análise enzimática da aspartato aminotransferase (AST, U L⁻¹) e alanina aminotransferase (ALT, U L⁻¹) foram realizadas em modo cinético utilizando kits comerciais (Labtest[®]), seguindo as recomendações do fabricante.

2.7 Atividade respiratória de leucócitos

A determinação da atividade respiratória de leucócitos foi realizada seguindo Biller-Takahashi et al. (2013). Resumidamente, 0,1 mL de sangue coletado com anticoagulante 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 a 540 nm.

2.8 Análise de lisozima

A lisozima foi determinada seguindo a metodologia de Abreu et al. (2009) e Ellis (1990). Em resumo, foi preparada uma solução estoque utilizando a lisozima (Sigma[®], Canadá) da clara de ovo de galinha (1 mg mL^{-1}) como padrão, e uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6,2). Para a solução de trabalho de lisozima (1 µg µL^{-1}) foi realizada a diluição da solução estoque dez vezes com tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4 ; 0,05 M; pH 6,2). Em cubetas plásticas de 1 mL, foram adicionadas diferentes concentrações de solução de lisozima padrão (1 µg µL^{-1}) (50 µL, 80 µL, 100 µL, 160 µL, 200 µL) e o volume foi completado para 300 µL com tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2). A mistura foi levada ao espectrofotômetro (Beckman DU-70S) e incubada, por dois minutos a 26°C. Após isso, foi adicionado 300 µL da suspensão de *M. lysodeikticus* ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) à mistura e a amostra foi lida em 450 nm para a obtenção da curva de calibração. As amostras de soro foram aquecidas em banho-maria, a 56 °C por 30 minutos, para inativar as proteínas do sistema complemento e certificar que a lise de *M. lysodeikticus* ocorreu exclusivamente pela ação da lisozima. Um volume de 175 µL de soro foram dispensados em tubos de ensaio contendo 125 µL de tampão fosfato de sódio. Essas amostras foram incubadas por dois minutos no espectrofotômetro a 26 °C e, então, foram adicionados 300 µL de suspensão de *M. lysodeikticus* ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$). A diferença entre a turbidez inicial e final (redução da densidade óptica (DO) foi medida entre 0,5 e 5 minutos a 450 nm. Os resultados foram expressos usando os valores de redução de DO para cada volume de amostra versus volume de amostra analisado (µL). A equação de regressão linear da curva de calibração da lisozima foi utilizada para determinar seus níveis séricos (µg mL^{-1}).

2.9 Estimulação da resposta imune com *Aeromonas jandaei*

No Laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, AM), a cepa

AM-70 de *A. jandaei* foi cultivada em ágar Triptona Soja (TSA - Kasvi, Espanha) e incubada a 28 °C por 24 h. Colônias foram diluídas em solução salina estéril para obtenção da concentração de 0,5 na escala de McFarland ou 10^8 UFC mL⁻¹.

Após os 60 dias de alimentação, 36 peixes de cada tratamento (n=9 por tanque) foram coletados, anestesiados com benzocaína (100 mg L⁻¹) e 100 µL de *A. jandaei* foram inoculados por via intraperitoneal. Em seguida os peixes foram devolvidos aos tanques de acordo com o tratamento. A sobrevivência dos peixes foi acompanhada por 15 dias, mas após os primeiros 10 dias, foi realizada a coleta sanguínea (n=3 por tanque) para análise dos parâmetros sanguíneos.

2.10 Análise estatística

Os dados foram expressos por meio de média \pm erro padrão. Todos os dados inicialmente foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e homocedasticidade de Levene. Para os dados que atenderam aos pressupostos, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e teste pos-hoc de Tukey. As variáveis dependentes que não atenderam aos pressupostos foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste pos-hoc de Dunn. Em ambos os casos foi utilizado o nível de significância de 5% para as análises.

3. Resultados

Os peixes alimentados com as dietas suplementadas com OE de *L. gracilis* e *C. citratus* durante 60 dias não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros de desempenho zootécnico (peso final, comprimento final, ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico, fator de condição) avaliados em relação ao tratamento controle (Tabela 1). Durante o período experimental de 60 dias não houve mortalidade dos peixes nos diferentes tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Desempenho de crescimento (média \pm erro padrão) de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* na dieta.

Parâmetros	Controle	<i>Lippia gracilis</i>		<i>Cymbopogon citratus</i>	
		5 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹	5 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹
PI(g)	56,23 \pm 1,51 ^a	60,71 \pm 1,91 ^a	55,48 \pm 2,08 ^a	57,83 \pm 2,77 ^a	55,42 \pm 0,70 ^a
PF(g)	136,99 \pm 3,90 ^a	140,96 \pm 5,19 ^a	131,88 \pm 2,76 ^a	137,83 \pm 4,55 ^a	134,66 \pm 2,06 ^a

CF (cm)	19,20 ± 0,23 ^a	19,60 ± 0,34 ^a	19,10 ± 0,17 ^a	19,42 ± 0,17 ^a	19,18 ± 0,11 ^a
GP (g)	80,75 ± 2,72 ^a	80,26 ± 3,48 ^a	76,41 ± 1,65 ^a	80,00 ± 1,87 ^a	79,24 ± 1,90 ^a
CA	1,24 ± 0,04 ^a	1,36 ± 0,03 ^a	1,31 ± 0,05 ^a	1,30 ± 0,04 ^a	1,26 ± 0,03 ^a
TCE (%)	1,48 ± 0,02 ^a	1,40 ± 0,02 ^a	1,44 ± 0,04 ^a	1,45 ± 0,03 ^a	1,48 ± 0,03 ^a
FC	1,91 ± 0,03 ^a	1,87 ± 0,04 ^a	1,89 ± 0,04 ^a	1,88 ± 0,02 ^a	1,91 ± 0,01 ^a
Sobrevivência (%)	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00

PI: Peso Inicial; PF: Peso Final; CF: Comprimento Final; GP: Ganho de Peso; CV: Conversão Alimentar; TCE: Taxa de Crescimento específico; FC: Fator de Condição. Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Em relação aos parâmetros hematológicos (Tabela 2) não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos índices de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos antes e após a estimulação com *A. jandaei*. Para o volume corpuscular médio, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre o tratamento contendo 5 g kg⁻¹ do OE de *L. gracilis* e o tratamento controle, na coleta realizada após a inoculação da bactéria. Já para a hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média não houve diferença significativa entre os tratamentos em ambos os períodos (após 60 dias de alimentação e 10 dias depois da estimulação com *A. jandaei*).

Nos parâmetros bioquímicos (Tabela 2), no tempo de 60 dias, os valores de proteínas totais, albumina, globulina e alanina aminotransferase (ALT) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, já a concentração de aspartato aminotransferase (AST) foi significativamente menor ($p < 0,05$) no tratamento com 5 g kg⁻¹ de *L. gracilis* em relação aos tratamentos com 10 g kg⁻¹ de *L. gracilis* e 10 g kg⁻¹ de OE de *C. citratus*. Após a estimulação com *A. jandaei*, os valores de proteínas totais apresentaram aumento significativo nos tratamentos com 5 g kg⁻¹ de *L. gracilis* e 5 g kg⁻¹ de *C. citratus* em relação ao controle, e ao tratamento com 10 g kg⁻¹ de *L. gracilis*. Já os índices de albumina, globulina, ALT e AST não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Nas análises imunológicas (Tabela 3) não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) na atividade respiratória de leucócitos e na concentração de lisozima nos dois períodos avaliados (após 60 dias e após estimulação com *A. jandaei*).

Tabela 2. Parâmetros hematológicos e bioquímicos (média \pm erro padrão) de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* na dieta antes e após estimulação com *Aeromonas jandaei*.

60 DIAS					
Parâmetros	Controle	<i>Lippia gracilis</i>		<i>Cymbopogon citratus</i>	
		5 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹	5 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹
Hct (%)	27,78 \pm 2,83	39,00 \pm 5,82	32,44 \pm 2,80	30,60 \pm 3,07	38,54 \pm 4,26
Hb(g dL ⁻¹)	11,00 \pm 0,59	11,70 \pm 1,11	11,90 \pm 0,34	11,20 \pm 0,54	12,00 \pm 0,50
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	2,49 \pm 0,45	2,65 \pm 0,19	1,75 \pm 0,14	2,68 \pm 0,29	2,55 \pm 0,19
VCM (fL)	156,11 \pm 39,70	148,51 \pm 16,30	161,13 \pm 16,60	140,68 \pm 27,20	142,09 \pm 25,60
HCM (pg)	57,00 \pm 8,73 ^{ab}	53,50 \pm 5,73 ^{ab}	64,00 \pm 7,60 ^a	42,60 \pm 4,37 ^{ab}	35,80 \pm 4,19 ^b
CHCM (%)	42,78 \pm 4,69	36,40 \pm 4,01	39,78 \pm 3,24	39,80 \pm 3,55	32,45 \pm 3,74
PT (g dL ⁻¹)	3,26 \pm 0,29	3,11 \pm 0,26	3,95 \pm 0,27	3,54 \pm 0,20	3,29 \pm 0,13
Albumina (g dL ⁻¹)	1,13 \pm 0,22	1,12 \pm 0,07	0,95 \pm 0,09	0,90 \pm 0,11	1,12 \pm 0,14
Globulinas (g dL ⁻¹)	2,69 \pm 0,47	2,19 \pm 0,34	3,14 \pm 0,22	2,71 \pm 0,16	2,35 \pm 0,15
ALT (U L ⁻¹)	42,50 \pm 1,58	43,70 \pm 2,45	41,70 \pm 5,20	43,70 \pm 4,42	46,20 \pm 3,53
AST (U L ⁻¹)	122,80 \pm 6,75 ^{ab}	69,53 \pm 15,86 ^b	137,52 \pm 15,07 ^a	95,06 \pm 6,96 ^{ab}	133,72 \pm 10,40 ^a
APÓS DESAFIO					
Parâmetros	Controle	<i>Lippia gracilis</i>		<i>Cymbopogon citratus</i>	
		5 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹	5 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹
Hct (%)	24,83 \pm 1,52	29,36 \pm 0,96	29,00 \pm 1,95	28,45 \pm 1,79	31,50 \pm 2,16
Hb(g dL ⁻¹)	12,50 \pm 0,82	12,30 \pm 0,81	10,70 \pm 0,58	11,50 \pm 0,81	13,00 \pm 0,84
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	2,78 \pm 0,23	2,15 \pm 0,21	2,23 \pm 0,18	2,33 \pm 0,25	2,79 \pm 0,24
VCM (fL)	88,76 \pm 5,59 ^b	137,02 \pm 11,41 ^a	127,87 \pm 10,39 ^{ab}	125,38 \pm 13,63 ^{ab}	132,29 \pm 13,87 ^{ab}
HCM (pg)	52,50 \pm 2,32	57,40 \pm 4,24	49,00 \pm 3,44	49,20 \pm 4,02	49,00 \pm 3,49
CHCM (%)	51,30 \pm 3,27	42,50 \pm 3,08	39,90 \pm 2,82	42,20 \pm 4,13	41,2 \pm 4,40
Pt(g dL ⁻¹)	1,96 \pm 0,52 ^b	3,58 \pm 0,13 ^a	1,97 \pm 0,37 ^b	3,14 \pm 0,38 ^{ac}	2,97 \pm 0,44 ^{abc}
Albumina (g dL ⁻¹)	1,33 \pm 0,09	1,10 \pm 0,11	0,98 \pm 0,06	0,99 \pm 0,15	1,05 \pm 0,09
Globulinas (g dL ⁻¹)	1,40 \pm 0,43	2,49 \pm 0,20	1,68 \pm 0,24	1,93 \pm 0,39	2,27 \pm 0,26
ALT (U L ⁻¹)	48,60 \pm 7,30	48,80 \pm 6,21	44,10 \pm 6,58	60,00 \pm 7,33	47,00 \pm 7,50
AST (U L ⁻¹)	121,67 \pm 5,70	119,14 \pm 19,00	138,40 \pm 8,88	160,30 \pm 13,30	100,80 \pm 25,80

Hct: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; RBC: número de eritrócitos; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular; Pt: proteínas totais; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05)

Tabela 3. Parâmetros imunológicos (média \pm erro padrão) de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* na dieta antes e após estimulação com *Aeromonas jandaei*.

60 DIAS					
Parâmetros	Controle	<i>Lippia gracilis</i>		<i>Cymbopogon citratus</i>	
		5 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹	5 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹
ARL(OD)	0,76 \pm 0,04	0,74 \pm 0,03	0,71 \pm 0,05	0,66 \pm 0,07	0,77 \pm 0,03
Lisozima (μ g ml ⁻¹)	0,19 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,20 \pm 0,02
APÓS DESAFIO					
Parâmetros	Controle	<i>Lippia gracilis</i>		<i>Cymbopogon citratus</i>	
		5 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹	5 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹
ARL(OD)	0,67 \pm 0,06	0,74 \pm 0,07	0,63 \pm 0,05	0,82 \pm 0,04	0,67 \pm 0,07
Lisozima (μ g ml ⁻¹)	0,18 \pm 0,02	0,24 \pm 0,03	0,24 \pm 0,03	0,20 \pm 0,02	0,22 \pm 0,03

ARL: Atividade Respiratória de Leucócitos

Não houve mortalidade dos peixes (Figura 1) após o período de estimulação com *A. jandaei*.

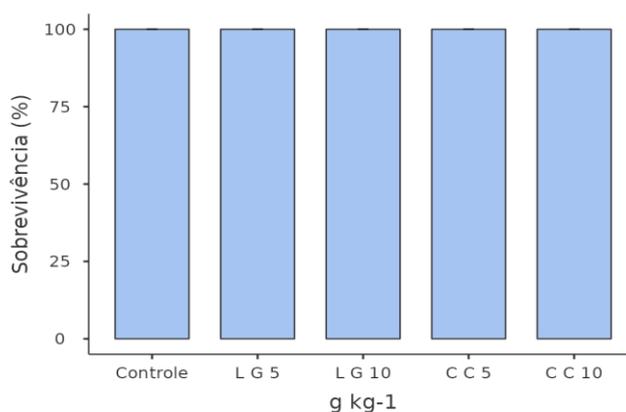


Figura 1. Sobrevivência de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* na dieta após estimulação com *Aeromonas jandaei*.

4. Discussão

A utilização dos OEs como alternativa natural ao uso de outros químicos é de grande relevância na aquicultura, pois muitos compostos são imunoestimulantes, o que permite maior resistência dos peixes às doenças. Como exemplo do carvacrol e timol, presentes no OE de *L. gracilis*; citral, presente no OE de *C. citratus*, os quais lhes conferem características antibacterianas (Cui et al., 2019; da Silva et al., 2022), antioxidantes e imunoestimulantes (Silva et al., 2021).

Neste estudo, a suplementação da dieta do tambaqui com os aditivos por 60 dias não foi suficiente para melhorar o desempenho zootécnico. Outros estudos com emprego de diferentes espécies de *Lippia* mostram resultados semelhantes: a inclusão do OE de *Lippia grata* (α -pineno 24,47%; 1,8-cineol 16,18%), sinonímia de *L. gracilis*, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 ml kg⁻¹, durante 60 dias em juvenis de tambatinga (*C.macropomum* x *P.brachypomus*)(Costa et al., 2022), assim como com o OE de *L. sidoides* (0,625 e 1,25 g kg⁻¹, timol - 76,6%) por 60 dias para juvenis de tambaqui (Monteiro et al., 2021). Por outro lado, estudos com o OE de *C. citratus* (α -citral 73,56%) mostram resultados diferentes aos relatados neste estudo, em que foram observados maior ganho de peso e peso final (4,73g) em tambaquis que receberam 0,25 e 0,50 ml kg⁻¹ do OE na dieta por 60 dias (Copatti et al., 2022b), bem como em tilápias do Nilo (*O. niloticus*) que receberam 200 e 400 mg kg⁻¹ do OE de *C. citratus* (α -citral - 31,80%) durante 12 semanas, cujos resultados incluíram aumento no ganho de peso diário, peso final e taxa de crescimento específico (Al-Sagheer et al., 2018). Essa variação de respostas no desempenho dos peixes com a utilização dos OEs pode estar relacionada a diversos fatores, como a variação no percentual dos componentes majoritários dos OEs, da espécie alvo e fase de crescimento, bem como o tempo e a forma de administração do produto (Campagnolo et al., 2013; da Silva et al., 2022).

A avaliação das condições fisiológicas dos peixes através de análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas é um importante indicador de estado de saúde dos peixes em resposta a alimentação, doenças e qualidade da água (Fazzio et al., 2019; Vo et al., 2022). Com relação aos parâmetros hematológicos dos tambaquis alimentados com os OEs de *L. gracilis* e *C. citratus* observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos após 60 dias de alimentação. De forma semelhante, Monteiro et al. (2021) também não observaram alterações nos parâmetros hematológicos de tambaquis alimentados com OE de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *Z. officinale* durante 60 dias, com exceção do aumento observado nos trombócitos de peixes que receberam OE de *O. gratissimum* (1,25 g kg⁻¹ e 5,0g kg⁻¹) na dieta. Já em tilápias do Nilo alimentadas com 2 ml kg⁻¹ do OE de *L. alba* durante 45 dias, foram observados aumento no hematócrito em relação ao tratamento controle, que pode indicar um aumento na capacidade de transporte de oxigênio, com consequente melhora no metabolismo dos peixes que receberam o OE (de Souza et al., 2019).

Neste presente estudo, foi observado que, após a estimulação do sistema imune dos peixes com a *A. jandaei*, houve uma redução nos valores de volume corpuscular médio (VCM) no tratamento controle comparado ao tratamento de 5 g kg⁻¹ OE de *L. gracilis*. Silva et al. (2021) avaliaram a inclusão do carvacrol na dieta de tilápia do Nilo na concentração de 40 g kg⁻¹

observaram redução do hematócrito e VCM em relação ao controle e ao tratamento com 10 g kg⁻¹ de carvacrol. De acordo com os autores, a alta concentração dos compostos foi prejudicial, causando anemia microcítica. Como observado no presente trabalho, também houve uma redução do hematócrito no tratamento controle após desafio, porém estatisticamente não significativa. Possivelmente, a infecção bacteriana pode ter ocasionado anemia nos peixes, evidenciados pelos valores reduzidos do hematócrito e VCM.

Os níveis de proteínas totais séricas não se alteraram nos 60 dias de alimentação. Já na coleta após o estímulo bacteriano, houve uma redução nos valores de proteínas, no tratamento controle, e no tratamento com 10 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis* em relação aos tratamentos com 5 g kg⁻¹ dos OEs de *L. gracilis* e *C. citratus*. Alterações nos valores de proteínas totais séricas podem estar relacionadas às circunstâncias físicas e fisiológicas ao qual o peixe se encontra (Ebrahimi et al., 2020). Variações nos valores de proteínas totais foram relatados por Copatti et al. (2022b), que avaliaram o efeito do OE de *C. citratus* em *C. macropomum* durante 60 dias. Os peixes que receberam 1,50 mL kg⁻¹ na dieta, apresentaram maior concentração de proteínas em relação ao tratamento controle. Ghafarifarsani et al. (2022) observaram que exemplares de carpa comum (*C. carpio*) que receberam o OE de tomilho (*Thymus vulgaris* – timol 45%) na dieta (0,5, 1 e 2%) por 60 dias também apresentaram os níveis de proteínas totais aumentados em relação ao controle. É possível que a diminuição dos níveis de proteína total sérica no presente estudo, nos tratamentos controle e com 10 g kg⁻¹ de OE de *L. gracilis* após a inoculação da bactéria, pode ser resultado de uma disfunção hepática e renal (Abdel-Tawwab et al., 2020), causada pela infecção bacteriana. Já os outros tratamentos apresentaram valores dentro dos padrões de variação relatados para a espécie, bem como podendo estar associado a uma melhor resposta da imunidade inata nos peixes (Ebrahimi et al., 2020; Ghafarifarsani et al., 2022).

No presente estudo, os índices de albumina e globulina não foram afetados pela adição dos OEs na dieta nos dois tempos amostrados (após 60 dias e após estimulação com *A. jandaei*). Os índices de albumina e globulina também podem ser utilizados para caracterizar a melhora nas respostas imune inata dos peixes (Ebrahimi et al., 2020). A albumina atua como antioxidante e é responsável pelo transporte de nutrientes no sangue, já a globulina atua principalmente nos processos inflamatórios (Ghafarifarsani et al., 2022).

Para os valores de ALT não houve diferença significativa entre os tratamentos com os OEs e grupo controle nos tempos de 60 dias e após o estímulo bacteriano, no presente trabalho. Estes valores estão próximos aos encontrados por Melo Souza et al. (2021) para tambaquis saudáveis. Entretanto, os valores de AST foram mais baixos nos tratamentos com 5 g kg⁻¹ do OE de *L. gracilis* em comparação com 10 g kg⁻¹ de *L. gracilis* e 10 g kg⁻¹ de OE de *C. citratus* no

tempo de 60 dias, mas não diferiram do controle. De forma semelhante, estudos mostram a redução da atividade da enzima AST em tilápias do Nilo recebendo 0,5 e 1 g kg⁻¹ do OE de orégano (*Origanum vulgare*) (carvacrol – 60,2% e timol 2%) na dieta por 8 semanas (Magouz et al., 2022). Também houve redução dos valores de AST em truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) que receberam 0,5 ml kg⁻¹ do OE de *T. vulgaris* (timol -38,74%, terpineno -33,58%) na dieta por dois meses em relação ao grupo controle (Zargar et al., 2019). As enzimas AST e ALT são encontradas nos hepatócitos e seu nível no soro sanguíneo são bastantes utilizadas para verificar danos hepáticos ocasionados por diversos fatores, como infecções (Zargar et al., 2019). Desta forma, a redução nos níveis de AST no presente estudo sugerem que o óleo essencial de *L. gracilis* na concentração de 5 g kg⁻¹ pode ter efeito hepatoprotetor (Ghafariarsani et al., 2022; Yousefi et al., 2022).

Em relação aos parâmetros imunológicos, não foi possível verificar alterações na concentração de lisozima na coleta de 60 dias e após estimulação com *A. jandaei*. A lisozima é uma enzima antimicrobiana que é um importante fator de defesa biológica da imunidade inata, tendo mecanismos que destroem a integridade da parede celular bacteriana, levando à morte do microorganismo (Song et al., 2021). Diversos estudos comprovam que a adição dos OEs de *Origanum vulgare*, *O. basilicum*, *M. piperita* e *L. sidoides* à dieta, pode aumentar a liberação dessas enzimas, melhorando a imunidade dos peixes, como relatado para carpa comum (Abdel-Lati et al., 2020), tilápia do Nilo (de Souza et al., 2019) e tambaqui (Ribeiro et al., 2018; Copatti et al., 2022^b). Em adição, a atividade respiratória de leucócitos também é um parâmetro bastante utilizado para verificar o efeito da administração de imunostimulantes na imunidade inata (Monteiro et al., 2021), pois o combate de infecções no organismo é realizado por intermediários da redução de oxigênio (explosão respiratória) como ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio singlete (¹O₂) e o radical hidroxila (OH⁻) (Vazirzadeh et al., 2017; Biller e Takahashi, 2018), que são produzidos pelas células fagocíticas durante a fagocitose (Devi et al., 2019). Entretanto, no presente estudo, a adição dos OEs de *L. gracilis* e *C. citratus* não afetou a atividade respiratória de leucócitos após 60 dias de alimentação e após estimulação bacteriana com *A. jandaei*.

A estimulação com *A. jandaei*, no presente estudo, não levou os peixes à mortalidade e nem a manifestarem sinais clínicos visíveis. As infecções por espécies do gênero *Aeromonas* possuem variadas manifestações clínicas, e seus diferentes fatores de virulência permitem que elas possam causar doenças (Fernández-Bravo e Figueras, 2020). No entanto, alguns fatores como a baixa densidade nos tanques, a falta de indução de estresse e a dosagem utilizada no presente trabalho podem ter favorecido a não instalação da doença nos peixes do tratamento

controle (Dong et al., 2017).

5. Conclusão

A inclusão dos óleos essenciais de *L. gracilis* e *C. citratus* mostraram efeitos não-deletérios na saúde dos peixes, uma vez que os mesmos não afetaram negativamente o seu desempenho zootécnico, nem a sobrevivência dos peixes após inoculação com dose-estímulo (10^8 UFC/mL) de *A. jandaei*.

O óleo essencial de *L. gracilis*, na dosagem de 5 g kg^{-1} , apresentou melhores resultados para AST e proteínas totais, podendo ser indicado para novos trabalhos. Além disso, faz-se necessário determinar a melhor via de inoculação e concentração de *Aeromonas* sp. para infectar experimentalmente o tambaqui.

Referências

- Abarike, E.D., Kuebutornye, F.K.A., Jian, J., Tang, J., Lu, Y., Cai, J., 2019. Influences of immunostimulants on phagocytes in cultured fish: a mini review. *Rev Aquacult* 11, 1219–1227. <https://doi.org/10.1111/raq.12288>
- Abdel-Latif, H.M.R., Abdel-Tawwab, M., Khafaga, A.F., Dawood, M.A.O., 2020. Dietary oregano essential oil improved the growth performance via enhancing the intestinal morphometry and hepato-renal functions of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Aquaculture* 526, 735432. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735432>
- Abdel-Tawwab, M., Khalifa, E., Diab, A.M., Khallaf, M.A., Abdel-Razek, N., Khalil, R.H., 2020. Dietary garlic and chitosan alleviated zearalenone toxic effects on performance, immunity, and challenge of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, to *Vibrio alginolyticus* infection. *Aquacult Int* 28, 493–510. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00477-0>
- Abreu, J.S., Marzocchi-Machado, C.M., Urbaczek, A.C., Fonseca, L.M., Urbinati, E.C., 2009. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Holmberg, 1887). *Braz. J. Biol.* 69, 1133–1139. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000500018>
- Almarri, S.H., Khalil, A.A., Mansour, A.T., El-Houseiny, W., 2023. Antioxidant, Immunostimulant, and Growth-Promoting Effects of Dietary *Annona squamosa* Leaf Extract on Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, and Its Tolerance to Thermal Stress and *Aeromonas sobria* Infection. *Animals* 13, 746. <https://doi.org/10.3390/ani13040746>
- Al-Sagheer, A.A., Mahmoud, H.K., Reda, F.M., Mahgoub, S.A., Ayyat, M.S., 2018. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquacult Nutr* 24, 1006–1014. <https://doi.org/10.1111/anu.12637>
- 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
- Assane, I.M., de Sousa, E.L., Valladão, G.M.R., Tamashiro, G.D., Criscoulo-Urbinati, E., Hashimoto, D.T., Pilarski, F., 2021. Phenotypic and genotypic characterization of *Aeromonas jandaei* involved in mass mortalities of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Brazil. *Aquaculture* 541, 736848. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736848>

- Awad, E., Awaad, A., 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 67, 40–54. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.034>
- Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Saita, M.V., Gimbo, R.Y., Urbinati, E.C., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Braz. J. Biol.* 73, 425–429. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842013000200026>
- Biller, J. D., Takahashi, L. S. 2018. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 90, 3403-3414.
- Braga De Oliveira, M.I., Rodrigues Brandão, F., Rocha Da Silva, M.J., Carvalho Rosa, M., Santana Farias, C.F., Silva Dos Santos, D., Majolo, C., Oliveira, M.R.D., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.R., Tavares-Dias, M., Chagas, E.C., 2021. *In vitro* anthelmintic efficacy of essential oils in the control of *Neoechinorhynchus buttnerae*, an endoparasite of *Colossoma macropomum*. *Journal of Essential Oil Research* 33, 509–522. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1921065>
- 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. saúde prod. anim.* 14, 565–573.
- Cardoso-Júnior, G.S., Rocha, G.F., Souza, D.M., Lopes, C.C., Pereira, H.B.J., Blank, A.F., Barbosa, F.H.F., Silva, C.M., Rodrigues, P.G., Oliveira-Júnior, G.M., 2021. Inhibitory action of *Lippia gracilis* Schauer essential oil on pathogenic bacteria and its effects as a growth promoter on quail. *Span J Agric Res* 19, 0603. <https://doi.org/10.5424/sjar/2021191-16101>
- Chung, S., Ribeiro, K., Melo, J.F.B., Teixeira, D.V., Vidal, L.V.O., Copatti, C.E., 2021. Essential oil from ginger influences the growth, haematological and biochemical variables and histomorphometry of intestine and liver of Nile tilapia juveniles. *Aquaculture* 534, 736325. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736325>
- Copatti, Carlos E., Felix e Silva, A., Lorenzo, V.P., Melo, J.F.B., 2022a. Addition of essential oil from *Lippia sidoides* to the diet of tambaqui: An analysis of growth, metabolic and blood parameters, and intestinal enzymes. *Aquaculture* 560, 738482. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738482>
- Copatti, Carlos E., Felix e Silva, A., Lorenzo, V.P., da Costa, M.M., Melo, J.F.B., 2022b. Addition of essential oil from lemongrass to the tambaqui (*Colossoma macropomum*) diet: Effects on growth, intestinal enzymes, haematological and metabolic variables, and antimicrobial challenge. *Aquaculture Research* 53, 5656–5666. <https://doi.org/10.1111/are.16048>
- Cordeiro, R.P., Braga, P.A.D.C., Jonsson, C.M., Brandão, F.R., Chagas, E.C., Reyes, F.G.R., 2022. Therapeutic efficacy and bioaccumulation of albendazole in the treatment of tambaqui (*Colossoma macropomum*) parasitized by acanthocephalan (*Neoechinorhynchus buttnerae*). *Aquaculture Research* 53, 1446–1455. <https://doi.org/10.1111/are.15677>
- Costa, O.T.F. da, Dias, L.C., Malmann, C.S.Y., Lima Ferreira, C.A. de, Carmo, I.B. do, Wischneski, A.G., Sousa, R.L. de, Cavero, B.A.S., Lameiras, J.L.V., Dos-Santos, M.C., 2019. The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. *Aquaculture* 499, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.040>
- Costa, T.S., Silva, R.C. da, Pretto, A., Monteiro, O. dos S., Siqueira, J.C. de, Baldisserotto, B., Lopes, J.M., 2022. Effect of *Lippia grata* essential oil as a feed additive on the performance of tambatinga juveniles. *Acta Amaz.* 52, 122–130. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202102442>
- Cui, H., Zhang, C., Li, C., Lin, L., 2019. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crops and Products* 139, 111498. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111498>
- da Silva, A.M.S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., de Alexandre Sebastião, F., 2022. Prospecting of essential oils in combination with florfenicol against motile *Aeromonas* isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arch Microbiol* 204, 392. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03015-4>
- da Silva, L.C., De Souza Perinotto, W.M., Sá, F.A., De Souza, M.A.A., De Oliveira Barbosa

- Bitencourt, R., Sanavria, A., Santos, H.A., Marie-Magdeleine, C., Da Costa Angelo, I., 2020. In vitro acaricidal activity of *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* and *Mentha arvensis* against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology* 216, 107937. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107937>
- de Souza, E.M., de Souza, R.C., Melo, J.F.B., da Costa, M.M., de Souza, A.M., Copatti, C.E., 2019. Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in Nile tilapia diet: growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. *Aquaculture* 504, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.052>
- de Souza Silva, L.T., de Pádua Pereira, U., de Oliveira, H.M., Brasil, E.M., Pereira, S.A., Chagas, E.C., Jesus, G.F.A., Cardoso, L., Mourinho, 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>
- 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. *Aquacult Nutr* 25, 39–45. <https://doi.org/10.1111/anu.12827>
- Devi, G., Harikrishnan, R., Paray, B.A., Al-Sadoon, M.K., Hoseinifar, S.H., Balasundaram, C., 2019. Effect of symbiotic supplemented diet on innate-adaptive immune response, cytokine gene regulation and antioxidant property in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 89, 687–700. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.036>
- Dien, L.T., Ngo, T.P.H., Nguyen, T.V., Kayansamruaj, P., Salin, K.R., Mohan, C.V., Rodkhum, C., Dong, H.T., 2023. Non-antibiotic approaches to combat motile *Aeromonas* infections in aquaculture: Current state of knowledge and future perspectives. *Reviews in Aquaculture* 15, 333–366. <https://doi.org/10.1111/raq.12721>
- Dong, H.T., Techatanakitarnan, C., Jindakittikul, P., Thaiprayoon, A., Taengphu, S., Charoensapsri, W., Khunrae, P., Rattanarajpong, T., Senapin, S., 2017. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J Fish Dis* 40, 1395–1403. <https://doi.org/10.1111/jfd.12617>
- dos Santos, M.C., Teodoro, A.V., Menezes, M.S., Pinto-Zevallos, D.M., de Fátima Arrigoni-Blank, M., Cruz Oliveira, E.M., Sampaio, T.S., Farias, A.P., Coelho, C.R., Blank, A.F., 2019. Bioactivity of essential oil from *Lippia gracilis* Schauer against two major coconut pest mites and toxicity to a non-target predator. *Crop Protection* 125, 104913. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104913>
- Ebrahimi, E., Haghjou, M., Nematollahi, A., Goudarzian, F., 2020. Effects of rosemary essential oil on growth performance and hematological parameters of young great sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture* 521, 734909. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734909>
- Edeh, I.C., Nsofor, C.I., 2023. Utilization of antibiotics in aquaculture; present status and future alternatives in the post covid-19 pandemic era: *The Bioscientist Journal* 11, 57–70.
- Ellis, A.E., 1990. Lysozyme Assays, in: *Techniques in Fish Immunology*. Fair Haven (USA).
- Fazio, F., 2019. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. *Aquaculture* 500, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>
- Felix e Silva, A., Pires, I.C., da Costa, M.M., Melo, J.F.B., Lorenzo, V.P., de Melo, F.V.S.T., Copatti, C.E., 2022. Antibacterial and antibiofilm activities and synergism with florfenicol from the essential oils of *Lippia sidoides* and *Cymbopogon citratus* against *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Microbiology* 132, 1802–1812. <https://doi.org/10.1111/jam.15336>
- Fernández-Bravo, A., Figueras, M.J., 2020. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms* 8, 129. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>
- Gallani, S.U., Valladão, G.M.R., Assane, I.M., Alves, L. de O., Kotzent, S., Hashimoto, D.T., Pilarski, F., 2020. Motile *Aeromonas* septicemia in tambaqui *Colossoma macropomum*:

- Pathogenicity, lethality and new insights for control and disinfection in aquaculture. *Microbial Pathogenesis* 149, 104512. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104512>
- Ghafari-farsani, H., Hoseinifar, S.H., Sheikhlari, A., Raissy, M., Chaharmahali, F.H., Maneepitaksanti, W., Faheem, M., Van Doan, H., 2022. The Effects of Dietary Thyme Oil (*Thymus vulgaris*) Essential Oils for Common Carp (*Cyprinus carpio*): Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, Antioxidant Defense, Tissue and Mucus Immune Parameters, and Resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Nutrition* 2022, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2022/7942506>
- Gilmour, K.M., 1997 Gas exchange. In: EVANS, D.H. (Ed.). *The Physiology of Fishes*. CRC Press, New York, New York, USA, p.101-127.
- Gonzales, A.P.P.F., Yoshioka, E.T.O., Mathews, P.D., Mertins, O., Chaves, F.C.M., Videira, M.N., Tavares-Dias, M., 2020. Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. *Aquaculture* 528, 735500. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735500>
- Hilsdorf, A.W.S., Hallerman, E., Valladão, G.M.R., Zaminhan-Hassemer, M., Hashimoto, D.T., Dairiki, J.K., Takahashi, L.S., Albergaria, F.C., Gomes, M.E. de S., Venturieri, R.L.L., Moreira, R.G., Cyrino, J.E.P., 2022. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. *Reviews in Aquaculture* 14, 993–1027. <https://doi.org/10.1111/raq.12638>
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, Produção da Pecuária Municipal, 2021 Disponível em: < www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria.html.> acesso em 05 novembro de 2021.
- Limbu, S.M., Chen, L., Zhang, M., Du, Z., 2021. A global analysis on the systemic effects of antibiotics in cultured fish and their potential human health risk: a review. *Rev. Aquacult.* 13, 1015–1059. <https://doi.org/10.1111/raq.12511>
- Magouz, F.I., Amer, A.A., Faisal, A., Sewilam, H., Aboelenin, S.M., Dawood, M.A.O., 2022. The effects of dietary oregano essential oil on the growth performance, intestinal health, immune, and antioxidative responses of Nile tilapia under acute heat stress. *Aquaculture* 548, 737632. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737632>
- Melo Souza, D.C., Santos, M.C., Sousa, R.L., Chagas, E.C., 2022. Profile of local and systemic humoral immune response in *Colossoma macropomum* infected by *Neoechinorhynchus buttnerae*. *Aquaculture Research* 53, 1131–1135. <https://doi.org/10.1111/are.15624>
- Mielke, T.D., Francisco, C.J., Dorella, F.A., Figueiredo, H.C.P., Tavares, G.C., Gallani, S.U., 2022. The strategic use of water additives for tambaqui *Colossoma macropomum* transport: New insights of bacteriosis and productivity approach. *Aquaculture* 558, 738406. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738406>
- Monteiro, P.C., Brandão, F.R., Farias, C.F.S., de Alexandre Sebastião, F., Majolo, C., Dairiki, J.K., de Oliveira, M.R., Chaves, F.C.M., de Almeida O'Sullivan, F.L., Martins, M.L., Chagas, E.C., 2021. Dietary supplementation with essential oils of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* on the growth and hemato-immunological parameters of *Colossoma macropomum* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Reports* 19, 100561. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100561>
- Oliveira, M.I B., Brandão, F.R., da Silva, M.J.R., Rosa, M.C., Farias, C.F.S., dos Santos, D.S., Majolo, C., Oliveira, M.R.D., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.R., Tavares-Dias, M., Chagas, E.C., 2021. *In vitro* anthelmintic efficacy of essential oils in the control of *Neoechinorhynchus buttnerae*, an endoparasite of *Colossoma macropomum*. *Journal of Essential Oil Research* 33, 509–522. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1921065>
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Eduem, Maringá (140 pp.).

- Ribeiro, S.C., Malheiros, D.F., Guillozki, 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* (Serrasalmidae) fed *Mentha piperita* essential oil. *Aquaculture* 490, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.024>
- Silva, J.M. da Paz, A. de L., Val, A.L., 2021. Effect of carvacrol on the haemato-immunological parameters, growth and resistance of *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalmidae) infected by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* 52, 3291–3300. <https://doi.org/10.1111/are.15174>
- Song, Q., Xiao, Y., Xiao, Z., Liu, T., Li, J., Li, P., Han, F., 2021. Lysozymes in Fish. *J. Agric. Food Chem.* 69, 15039–15051. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06676>
- Vazirzadeh, A., Dehghan, F., Kazemeini, R., 2017. Changes in growth, blood immune parameters and expression of immune related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to diet supplemented with *Ducrosia anethifolia* essential oil. *Fish & Shellfish Immunology* 69, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.022>
- Vijayaram, S., Sun, Y.-Z., Zuorro, A., Ghafarifarsani, H., Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., 2022. Bioactive immunostimulants as health-promoting feed additives in aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology* 130, 294–308. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.011>
- Vo, V.-T., 2022. Hematological Parameters of Red Tilapia (*Oreochromis* sp.) Fed Essential Oils of *Mentha piperita* after Challenge with *Streptococcus agalactiae*. *PJZ.* <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20211106031127>
- Yousefi, M., Ghafarifarsani, H., Hoseini, S.M., Hoseinifar, S.H., Abtahi, B., Vatnikov, Y.A., Kulikov, E.V., Van Doan, H., 2022. Effects of dietary thyme essential oil and prebiotic administration on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) welfare and performance. *Fish & Shellfish Immunology* 120, 737–744. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.023>
- Zargar, A., Rahimi-Afzal, Z., Soltani, E., Taheri Mirghaed, A., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Soltani, M., Yuosefi, P., 2019. Growth performance, immune response and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed *Thymus vulgaris* essential oils. *Aquac Res* 50, 3097–3106. <https://doi.org/10.1111/are.14243>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A procura por produtos alternativos que possam fortalecer o sistema imunológico dos peixes vem sendo priorizada, e os estudos utilizando os óleos essenciais nessa função se deve à sua comprovada ação imunoestimulante, antimicrobiana e antioxidante. A escolha dos OEs de *Lippia gracilis* e *Cymbopogon citratus* nesse trabalho ocorreu devido aos compostos principais presentes nesses óleos, os quais já possuem também comprovada ação profilática. Entretanto, há poucos trabalhos utilizando os OEs dessas plantas em peixes, principalmente em tambaqui.

Foi possível observar que após o estímulo com a bactéria *Aeromonas jandaei*, os peixes que não receberam os OEs de *L. gracilis* e *C. citratus* na dieta ficaram mais suscetíveis à infecção, pois apresentaram menores valores de VCM e proteínas totais em relação aos peixes que receberam as menores concentrações (5 g kg^{-1}) dos óleos essenciais de *L. gracilis* e *C. citratus*. Além disso, os óleos não causaram danos hepáticos aos peixes após o fornecimento via dieta pelo período de 60 dias e nem após a inoculação bacteriana. Diante disso, é possível verificar o potencial dos tratamentos avaliados neste estudo para construção de uma aquicultura mais sustentável.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- CHUNG, S. et al. Inclusion of essential oil from ginger in the diet improves physiological parameters of tambaqui juveniles (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 543, p. 736934, 15 out. 2021.
- COSTA, O. T. F. DA et al. The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, v. 499, p. 260–268, 15 jan. 2019.
- DA SILVA, A. M. S. et al. Prospecting of essential oils in combination with florfenicol against motile *Aeromonas* isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 7, p. 392, 15 jun. 2022.
- DAWOOD, M. A. O. et al. Antiparasitic and Antibacterial Functionality of Essential Oils: An Alternative Approach for Sustainable Aquaculture. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 185, fev. 2021.
- EL-SHERBENY, E. M. EL.; KHORIS, E. A.; KASSEM, S. Assessment the efficacy of some various treatment methods, in vitro and in vivo, against *Aeromonas hydrophila* infection in fish with regard to side effects and residues. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 253, p. 109246, 1 mar. 2022.
- ELUMALAI, P. et al. Herbal Immunomodulators in Aquaculture. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 29, n. 1, p. 33–57, 2 jan. 2021.
- FERNÁNDEZ-BRAVO, A.; FIGUERAS, M. J. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 129, 17 jan. 2020.
- GALLANI, S. U. et al. Motile *Aeromonas* septicemia in tambaqui *Colossoma macropomum*: Pathogenicity, lethality and new insights for control and disinfection in aquaculture. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104512, 1 dez. 2020.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, Produção da Pecuária Municipal, 2021 Disponível em: < www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria.html.> acesso em 05 novembro de 2021.
- MONTEIRO, P. C. et al. Dietary supplementation with essential oils of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* on the growth and hemato-immunological parameters of *Colossoma macropomum* challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100561, 1 mar. 2021.
- PEREIRA, C. et al. Bacteriophages in the Control of *Aeromonas* sp. in Aquaculture Systems: An Integrative View. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 163, 27 jan. 2022.
- RODRIGUES, F. S. et al. Sistema imune inato de peixes e o uso do alho como imunoestimulante: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. e152943014, 21 mar. 2020.
- SHOURBELA, R. M. et al. Oregano essential oil enhanced the growth performance, immunity, and antioxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems. **Aquaculture**, v. 542, p. 736868, 15 set. 2021.

VALENTI, W. C. et al. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100611, mar. 2021.