

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN E *Aloysia triphylla*  
(L'Hérit) BRITTON COMO ANTIMICROBIANO E ADITIVO NA DIETA DE  
TILÁPIA DO NILO**

**RENILDE CORDEIRO DE SOUZA**

**SALVADOR - BAHIA**

**ABRIL - 2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN E *Aloysia triphylla*  
(L'Hérit) BRITTON COMO ANTIMICROBIANO E ADITIVO NA DIETA DE  
TILÁPIA DO NILO**

**RENILDE CORDEIRO DE SOUZA**  
**Zootecnista**

**SALVADOR - BAHIA**  
**ABRIL - 2017**

**RENILDE CORDEIRO DE SOUZA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN E *Aloysia triphylla* (L'Hérit) BRITTON COMO ANTIMICROBIANO E ADITIVO NA DIETA DE TILÁPIA DO NILO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Copatti  
Coorientadores: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa  
Prof. Dr. José Fernando Bibiano Melo

**SALVADOR - BA**

**ABRIL - 2017**

Sistema de Bibliotecas da UFBA

S7260 Souza, Renilde Cordeiro de  
ÓLEO ESSENCIAL DE Lippia alba (Mill.) N. E. BROWN E Aloysia  
triphylla (L'Hérit) BRITTON COMO ANTIMICROBIANO E ADITIVO NA  
DIETA DE TILÁPIA DO NILO / Renilde Cordeiro de Souza. --  
Salvador, 2017.  
131 f.: il

Orientador: Carlos Eduardo Copatti.  
Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) --  
Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária  
e Zootecnia, 2017.

1. Tilápia (Peixe) - Criação. 2. Nutrição de peixes. 3.  
Imunoestimulante. 4. Óleos essenciais. I. Copatti, Carlos  
Eduardo. II. Título.

CDD 639.3758


**ÓLEO ESSENCIAL DE Lippia alba (Mill.) N. E. Brown e  
Aloysia triphylla (L'hér.) Britton COMO ADITIVO NA DIETA PARA  
TILÁPIA-DO-NILO**

Renilde Cordeiro de Souza

Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia

Salvador, 27 de abril de 2017

Comissão examinadora:



---

**Dr. Carlos Eduardo Copatti**  
UFBA  
Orientador / Presidente



---

**Dr. Luiz Vitor Oliveira Vidal**  
UFBA

---

**Dr. Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro**  
UFBA



---

**Dr. Luciano de Oliveira Garcia**  
FURG



---

**Dra. Denise Solédade Peixoto Pereira**  
UFRB

*As misericórdias do SENHOR são a causa de não sermos consumidos, porque as suas  
misericórdias não têm fim;  
renovam-se cada manhã. Grande é a tua fidelidade.*

*Bíblia sagrada – Lamentações 3: 22-23.*

*Este trabalho é dedicado a minha mãe, e a memória dos meus avós (Antônio Joaquim de Oliveira, Otacília Cordeiro de Oliveira, Perpétua Maria da Conceição e Ananias Rodrigues de Souza), irmãos, sobrinhos e toda minha família.*

## AGRADECIMENTOS

A ele, o autor da vida, porque ele é bom e suas misericórdias não têm fim, renovam-se cada manhã. Por me conceder vida, saúde e disposição para enfrentar os obstáculos da vida que foram e continuam sendo muitos, mas ele é fiel e justo para nos dar infinitamente mais do que pensamos. Deus. A ele a glória...!

Foram muitos caminhos trilhados, muitas lutas vencidas, muitas pessoas pelo caminho, as quais foram muito importantes neste processo.

A toda a minha família, mãe, irmãos, sobrinhos, tios (especialmente Maria José), primos, pela torcida, força e intercessão nos momentos difíceis. Vocês são tudo na minha vida!!

A minha amiga Lucileide Gomes, pela amizade e companheirismo, pela ajuda em todos os momentos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de estudo, muito importante para a realização deste projeto de vida.

Ao programa de Pós-Graduação da UFBA pela oportunidade de cursar o doutorado.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Copatti, o melhor orientador que eu poderia ter, pela confiança, atenção, dedicação, comprometimento, ajuda e ensinamentos. Não me esquecerei da frase mais importante que dissestes ao longo destes quatro anos. “Minha função é ajudar vocês...” O senhor é realmente um orientador!

Ao meu coorientador prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa, pela confiança, pelo convite e oportunidade a mim concedida após a graduação para fazer parte da “Família Micro”. Exemplo de humildade, trabalho, competência e dedicação.

Ao também meu coorientador prof. Dr. Fernando Bibiano Melo, por abrir as portas do laboratório de aquicultura, pelos ensinamentos e dúvidas tiradas.

Ao meu grande amigo e irmão de todas as horas Seldon Almeida de Souza. Pelas madrugadas de estudos, sua disposição incondicional em me ajudar em tudo que sempre precisei. Você é realmente um mestre e um grande amigo.

A Ana Patrícia Borges e família por toda ajuda e acolhida principalmente nesta etapa final.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Univasf, especialmente Maria da Conceição, Antônio Wilton Fernandes, Chirles França, Ruan Emmanuel, Samira Teixeira, Diego Castro parceiro de todo dia e toda hora, Naiana



Braga, Samilly Aquino, Naedja Carla e demais colegas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de aquicultura da Univasf, Geraldo Fernandes, Altiery Félix, Eloilton, Thaimara e demais colegas por toda ajuda no andamento e finalização dos experimentos.

Aos “brothers” da república em Salvador, Ricardo Uriel, Sansão de Paula, Clésio Morgado, Thomaz Guimarães, pela boa convivência, e nossos momentos “família”.

A Jocely (Nykita Souza) por aquele abraço após a saída da qualificação. Foi muito importante!

Aos colegas do Laboratório de Estudos e Fisiologia de Fauna Aquática, especialmente ao Rafael Rivas grande parceiro, Janis Hollenwerger, Artur Sena, Elizangela Maria e demais membros.

A Codevasf, pela doação dos peixes, e pela disponibilidade do local e todo equipamento necessário para realização deste trabalho.

Aos funcionários da Codevasf Rozzanno Cavalcanti, Adriana Nascimento, Liége Balzana, Marcelo Barbalho, Francisco José, e a todos os funcionários do campo que me ajudaram de alguma forma, especialmente ao Fernando, Senhor Inácio, Maurílio e demais funcionários pela atenção e toda ajuda.

Ao Instituto Federal do Sertão Pernambucano na pessoa da amiga Prof. Carla Samantha, e Prof. Daniel Amaral por toda ajuda e suporte, pela disponibilização de laboratório e equipamentos para realização deste trabalho.

Aos estagiários do Nupa (IF Sertão Pernambucano) especialmente Roberto Magalhães, Bárbara Soares, Ítalo Ramos e demais alunos por toda ajuda a mim concedida.

A Dr. Daniela Campeche, Embrapa semiárido, pela concessão do laboratório para realização do experimento em parceria com a Codevasf.

Aos Laboratórios de Bioquímica e Parasitologia da Univasf prof. Wagner Pereira e prof. Márcia Medeiros pela concessão de equipamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

E por fim ao não menos importante, meu cachorrinho Lucky que sempre esteve me fazendo companhia de dia e nas madrugadas nos momentos de escrita.

**Muito obrigada.**

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

#### Atividade antimicrobiana e sinérgica dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* e *Lippia alba* em *Aeromonas* spp.

	<b>Página</b>
Figura 1. Sensibilidade de <i>Aeromonas</i> spp. frente aos óleos essenciais de <i>A. triphylla</i> e <i>L. alba</i> . CBM = Concentração Bactericida mínima.....	54

### Capítulo 2

#### Óleo essencial de *Aloysia triphylla* na dieta de juvenis de tilápia do Nilo

	<b>Página</b>
Figura 1: Desenvolvimento de juvenis de tilápia do Nilo ( <i>O. niloticus</i> ) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de <i>A. triphylla</i> durante 45 dias (n = 40 por tratamento). GPM = Ganho de peso médio. TCR= Taxa de crescimento relativo. TCE=Taxa de crescimento específico. CMTR= Consumo médio total de ração. CAA: Conversão alimentar aparente. A: $y = -6,351 + 0,242x$ ; $R^2 = 0,65$ . B: $y = -10,636 + 0,136x$ ; $R^2 = 0,61$ . C: $y = -6,364 + 0,0262x$ ; $R^2 = 0,67$ . D: $y = 178,786 - (126,518x) + (22,407x^2)$ ; $R^2 = 0,69$ . E: $y = 609,914 - (22,396x) + (0,206x^2)$ ; $R^2 = 0,94$ . F: $y = -85,162 + (96,188x) - (26,641x^2)$ ; $R^2 = 0,66$ .....	84
_____ 2: Atividade das enzimas intestinais de juvenis de tilápia do Nilo ( <i>O. niloticus</i> ) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de <i>A. triphylla</i> durante 45 dias (n = 8 por tratamento). A: $y = 2,406 - 3,299x$ ; $R^2 = 0,67$ . B: $y = -1,291 + 0,0224x$ ; $R^2 = 0,75$ . C: $y = -1,413 + 0,868x$ ; $R^2 = 0,81$ .....	85
_____ 3: Parâmetros hematológicos de juvenis de tilápias do Nilo ( <i>O.</i>	

*niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *A. triphylla* durante 45 dias (n = 8 por tratamento). VCM= Volume corpuscular médio. HCM= Hemoglobina corpuscular média. CHCM= Concentração de hemoglobina corpuscular média. A:  $y = -15,600 + 0,523x$ ;  $R^2 = 0,75$ . B:  $y = -13,774 + 3,308x$ ;  $R^2 = 0,85$ . C:  $y = 16,626 - 0,912x$ ;  $R^2 = 0,79$ . D:  $y = 110,672 - 2,769x + 0,0172x^2$ ;  $R^2 = 0,74$ . E:  $y = 5,201 - 0,107x$ ;  $R^2 = 0,69$ . F:  $y = 8,429 - 0,136x$ ;  $R^2 = 0,75$ ..... 86

\_\_\_\_\_4: Parâmetros bioquímicos plasmáticos de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *A. triphylla* durante 45 dias (n = 8 por tratamento). ALT= Alanina amino transferase. A:  $y = 43,179 - 1,778x$ ;  $R^2 = 0,83$ . B:  $y = 194,252 - (3,635x) + (0,0168x^2)$ ;  $R^2 = 0,83$ . C:  $y = 3,8342 + (1,4797x) - (0,7228x^2)$ ;  $R^2 = 0,94$ . D:  $y = -3,250 + 2,398x$ ;  $R^2 = 0,94$ . E:  $y = -1,058 + 0,937x$ ;  $R^2 = 0,97$ ..... 87

\_\_\_\_\_5: Atividade de lisozima e sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *A. triphylla* durante 45 dias (n = 8 por tratamento). A:  $y = -0,248 + 3,853x$ ;  $R^2 = 0,96$ ..... 88

### Capítulo 3

#### Óleo essencial de *Lippia alba* na alimentação de juvenis de tilápia do Nilo e seu efeito após inoculação com *Aeromonas* spp.

#### Página

Figura 1 - Desempenho de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba* durante 45 dias (n = 12 por tratamento). GPM = Ganho de Peso Médio. CAA= Consumo Alimentar Aparente. TCE= Taxa de crescimento específico. TCR= Taxa de crescimento relativo. IHS= Índice hepatossomático. A:  $y = -1553,303 + (57,379x) - (0,529x^2)$ ;  $R^2 = 0,72$ . B:  $y = 0,105x^2 - 0,2677x + 1,411$ ;  $R^2 = 0,93$ . C: y

= -51,783 + 16,304x;  $R^2= 0,88$ . D:  $y = -27,315 + 0,0860x$ ;  $R^2= 0,87$ . E:  $y = -736,968 + (625,720x) - (132,568x^2)$ ;  $R^2= 0,69$ ..... 112

\_\_\_\_\_2 - Parâmetros hematológicos de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba* durante 45 dias (n = 12 por tratamento). CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média. A:  $y = -1269,104 + (91,348x) - (1,641x^2)$ ;  $R^2= 0,95$ . B:  $y = 970,248 - (245,976x) + (15,588x^2)$   $R^2= 0,71$ . C:  $y = -567,876 + (38,936x) - (0,666x^2)$ ;  $R^2= 0,70$ ..... 113

\_\_\_\_\_3 - Parâmetros metabólicos plasmáticos de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba* durante 45 dias (n = 12 por tratamento). A:  $y = -5,215 + 0,0984x$ ;  $R^2 = 0,69$ . B:  $y = 14,741 - (0,335x) + (0,00181x^2)$ ;  $R^2= 0,73$ . C:  $y = -181,491 + (1,918x) - (0,00501x^2)$ ;  $R^2= 0,94$ ..... 114

\_\_\_\_\_4 - Parâmetros proteicos e enzimáticos plasmáticos de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba* durante 45 dias (n = 12 por tratamento). A:  $y = 523,516 - (268,070x) + (34,313x^2)$   $R^2= 0,79$ . B:  $y = 11,993 - 3,676x$ ;  $R^2= 0,74$ . C:  $y = 166,743 - (452,294x) + (306,303x^2)$ ;  $R^2= 0,69$ . D:  $y = -5,813 + 24,858x$ ;  $R^2= 0,87$ ..... 115

\_\_\_\_\_5 – Atividade de lisozima plasmática (n=12 por tratamento) e sobrevivência pós-desafio com *Aeromonas* spp. (n = 28 por tratamento) de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba* durante 45 dias. A:  $y = 0,603 - (5,726x) + (6,029x^2)$ ;  $R^2= 0,97$ . B:  $y = -1,127 + (0,0328x)$   $R^2= 0,8$ ..... 116

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

#### Atividade antimicrobiana e sinérgica dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* e *Lippia alba* em *Aeromonas* spp.

	<b>Página</b>
Tabela 1. Classificação dos isolados de <i>Aeromonas</i> spp. quanto a produção de biofilme. $DO_A$ = Densidade ótica da amostra teste; $DO_{CN}$ = Densidade ótica do controle negativo (MERINO et al., 2009). .....	51
_____2. Composição química do óleo essencial de <i>Aloysia triphylla</i> . IRC: Índice de retenção calculado; IRL: Índice de retenção da literatura (NIST, 2008; ADAMS, 2009). .....	53
_____3. Composição química do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> . IRC: Índice de retenção calculado; IRL: Índice de retenção da literatura (NIST, 2008; ADAMS, 2009). .....	54
_____4. Classificação dos isolados de <i>Aeromonas</i> spp. quanto a produção de biofilme. (NOSTRO et al., 2007). DO = densidade ótica. DO do meio = 0,07.....	55
_____5: Classificação dos isolados de <i>Aeromonas</i> spp. quanto a produção de biofilme na presença dos óleos essenciais de <i>A. triphylla</i> e <i>L. alba</i> . (NOSTRO et al., 2007). DO = densidade ótica.....	56
_____6: Atividade dos óleos essenciais de <i>A. triphylla</i> e <i>L. alba</i> sobre o biofilme consolidado de <i>Aeromonas</i> spp. (NOSTRO et al., 2007). DO = densidade ótica.....	56
_____7: Índice de concentração inibitória fracionária (IFIC) utilizado para determinar o tipo de interação entre o óleo essencial de <i>Aloysia triphylla</i> (OEAT) e o florfenicol em isolado (10M) de <i>Aeromonas</i> spp. FIC= Índice de fração	

combinatória. FLOR= Florfenicol..... 57

\_\_\_\_\_ 8: Índice de concentração inibitória fracionária (IFIC) utilizado para determinar o tipo de interação entre o óleo essencial de *Lippia alba* (OELA) e o florfenicol em isolado (10M) de *Aeromonas* spp..... 58

## Capítulo 2

### Óleo essencial de *Aloysia triphylla* na dieta de juvenis de tilápia do Nilo

Tabela 1. Formulação e composição percentual da dieta basal..... 80

## Capítulo 3

### Óleo essencial de *Lippia alba* na alimentação de juvenis de tilápia do Nilo e seu efeito após inoculação com *Aeromonas* spp.

Tabela 1. Formulação e composição percentual da dieta basal..... 108

**LISTA DE SIGLAS**

$\mu\text{L}$  - microlitro

ABPA - Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura

CBM - Concentração bactericida mínima

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média

CIM - Concentração inibitória mínima

CIRPA - Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura

CLSI - Clinical and Laboratory standards institute

Cm - centímetros

CODEVASF - Companhia de Desenvolvimento do Vales do São Francisco e do Parnaíba

DMSO - Dimetilsulfóxido

DO - Densidade ótica

DO<sub>A</sub> - Densidade ótica da amostra

DO<sub>CN</sub> - Densidade ótica do controle negativo

ED - Energia digestível

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

Fig. - Figura

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFI - Índice de concentração inibitória fracionária

IHS - Índice hepatossomático

MH - Müller Hinton

mL/kg - Mililitros por quilograma

mM - Milimolar

nm - Nanômetros

NRC - National Research Council

OEAT - Óleo essencial de *Aloysia triphylla*

OELA - Óleo essencial de *Lippia alba*

PB - Proteína bruta

pH - Potencial hidrogeniônico

TCE - Taxa de crescimento específico

TSB - Tryptone Soya Broth

UFC - Unidade formadora de colônia

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Introdução geral.....	18
Revisão de literatura geral.....	20
Aquicultura mundial e brasileira.....	20
Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	21
Bacteriose por <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	21
Formação de biofilme bacteriano.....	23
Uso de antimicrobianos na produção animal.....	24
Uso de óleos essenciais na piscicultura.....	25
Óleos essenciais e mecanismo de ação.....	26
<i>Lippia alba</i> .....	27
<i>Aloysia triphylla</i> .....	28
Referências.....	29

## Capítulo 1

### **Atividade antimicrobiana e sinérgica dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* e**

### ***Lippia alba* em *Aeromonas* spp.**

	<b>Página</b>
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e Métodos.....	49
Óleos essenciais.....	49
Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> .....	49
Análise da capacidade de formação do biofilme.....	50
Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de <i>Aloysia triphylla</i> e <i>Lippia alba</i> em isolados de <i>Aeromonas</i> spp.....	51
Interferência dos óleos essenciais de <i>Aloysia triphylla</i> e <i>Lippia alba</i> com o biofilme consolidado em isolados de <i>Aeromonas</i> spp.....	52
Efeito sinérgico dos óleos essenciais de <i>Aloysia triphylla</i> e <i>Lippia alba</i> com	

florfenicol.....	52
Resultados.....	53
Composição química dos óleos essenciais de <i>Aloysia triphylla</i> e <i>Lippia alba</i> .....	53
Atividade antimicrobiana.....	54
Discussão.....	59
Conclusão.....	63
Agradecimentos.....	63
Referências.....	63

## Capítulo 2

### **Óleo essencial de *Aloysia triphylla* na dieta de juvenis de tilápia do Nilo**

Resumo.....	75
Abstract.....	76
Introdução.....	77
Material e Métodos.....	78
Óleo essencial de <i>Aloysia triphylla</i> .....	78
Animais e condições experimentais.....	79
Dietas experimentais e alimentação.....	79
Avaliação do desempenho.....	80
Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	81
Avaliação de atividade de enzimas intestinais.....	81
Atividade de lisozima.....	82
Teste de desafio com <i>Aeromonas</i> spp.....	83
Análise estatística.....	83
Resultados.....	83
Discussão.....	88
Conclusão.....	93
Agradecimentos.....	93
Referências.....	93

### Capítulo 3

#### **Óleo essencial de *Lippia alba* na alimentação de juvenis de tilápia do Nilo e seu efeito após inoculação com *Aeromonas* spp.**

Resumo.....	103
Abstract.....	104
Introdução.....	105
Material e Métodos.....	107
Obtenção do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> .....	107
Local, animais experimentais e condições de cultivo.....	107
Formulação, elaboração das dietas e desenho experimental.....	107
Manejo alimentar e desempenho zootécnico.....	108
Análises bioquímicas e hematológicas.....	109
Parâmetro imune não específico - atividade de Lisozima.....	109
Infecção experimental com <i>Aeromonas</i> spp.....	110
Análise estatística.....	111
Resultados.....	111
Discussão.....	116
Conclusão.....	120
Agradecimentos.....	120
Referências.....	121
Considerações finais e implicações.....	130
Anexos.....	131

## INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura tem se firmado como um importante agronegócio econômico, responsável pelo aumento da oferta mundial de pescado, uma vez que atualmente a maior ingestão proteica animal da população mundial é proveniente dos peixes (FAO, 2016). Este crescimento exigirá um aumento na produção da ordem de 100 milhões de toneladas até 2030 e o Brasil é um dos países que melhor se insere neste contexto (ABPA, 2014).

O Brasil apresenta potencial natural para produção de organismos aquáticos devido ao seu extenso território, condições climáticas favoráveis como temperaturas elevadas na maior parte do ano, alta produção de grãos para fabricação de rações, diversidade de espécies com potencial para cultivo em cativeiro, além de mercado consumidor em expansão e ainda pouco explorado (CREPALDI et al., 2006; ABPA, 2014).

A tilápia do Nilo é a espécie de maior produção e importância na piscicultura nacional por reunir características como excelente desempenho em sistemas de produção, versatilidade em se adaptar aos diversos ambientes e resistência às enfermidades, além de possuir carne de alta qualidade nutricional, preferida assim pelo mercado consumidor (VILA NOVA et al., 2005; FERREIRA et al., 2011; YAKUBU et al., 2014).

A expansão da tilapicultura deve-se a fatores como avanços tecnológicos e intensificação da criação em gaiolas, caracterizada por altas densidades de estocagem. Contudo, esse fator aliado às práticas rotineiras de manejo excessivo, como biometrias, transporte além da dificuldade na manutenção da qualidade de água, submetem os peixes a estresse constante, afetam a imunidade e favorecem o aparecimento de doenças bacterianas, causa de perdas econômicas significativas (LI et al., 2004).

A alta incidência de bacterioses nos sistemas de cultivo como as ocasionadas pelo gênero *Aeromonas* spp. (GASTALHO et al., 2014) tem promovido o crescimento acentuado na utilização de antimicrobianos pelos produtores na tentativa de melhorar as condições de saúde dos organismos de cultivo. Apesar do uso constante de alguns antimicrobianos como promotores de crescimento e no controle de infecções bacterianas, estes vêm sofrendo severas restrições devido a efeitos adversos em função do seu efeito residual na carne e risco ambiental. O uso descontrolado e excessivo de tais compostos, propicia aos micro-organismos a aquisição e a transferência de genes de resistência, o que

pode tornar ineficaz diversos fármacos utilizados na piscicultura (SCHWARZ et al., 2001; STOLKER e BRINKMAN, 2005; AHIRRAO e SURYAWANSHI, 2016).

Nesse sentido, é necessário encontrar alternativas ambientalmente sustentáveis, facilmente disponíveis, e sem ou com poucos efeitos colaterais, como é o caso dos óleos essenciais (OE) de plantas, cuja atividade antimicrobiana em diversos patógenos já é consolidada, com resultados consideráveis também sobre o desempenho dos peixes (ZHENG et al., 2009; SHEHATA et al., 2013; ZEPPENFEL et al., 2015; SUTILI et al., 2015; MAJOLO et al., 2016).

O uso de aditivos na nutrição de peixes tem ganhado atenção especial, pois melhoram o bom funcionamento fisiológico do animal, através de compostos que ofereçam benefícios a sua saúde, com promoção de eficiência na resposta imune (SOLTANI et al., 2010; BASHA et al., 2013).

Os benefícios do uso de fitogênicos em níveis adequados deve-se ao fato de serem biodegradáveis e acredita-se que sejam seguros para saúde dos animais e do homem (KALEMBA e KUNICKA, 2003; JAFRI et al., 2014). Entretanto, poucas são as investigações científicas *in vivo* na produção animal, especialmente quanto à utilização de espécies encontradas na flora brasileira na dieta de peixes.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo identificar, quantificar os constituintes e avaliar o potencial biocida, antibiofilme e sinérgico entre antibiótico e os OE de *Aloysia triphylla* e *Lippia alba*, bem como sua inclusão na dieta sobre parâmetros de crescimento, imunidade e respostas metabólicas em tilápia do Nilo infectadas experimentalmente com *Aeromonas* spp.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Aquicultura mundial e brasileira

A aquicultura envolve todas as atividades ligadas ao cultivo de organismos com ciclo de vida total ou parcial em meio aquático, como peixes, crustáceos, moluscos, plantas aquáticas, répteis e anfíbios. É o setor da produção animal que mais cresce no mundo, com perspectiva de expansão e intensificação na produção em quase todas as regiões mundiais (FAO, 2016).

Devido a estagnação dos recursos pesqueiros extrativos, a aquicultura tem aumentado a sua produção. Em 2014, vinte e cinco países registraram produção de 200.000 toneladas. Para o ano de 2050, esta foi estimada em 93 milhões de toneladas para suprir a demanda de pescados pela população mundial (BOYD e LI, 2011; YUE, LIN e LI, 2016).

A China é o maior produtor mundial, com 45,5 milhões de toneladas, seguida pela Indonésia e Índia. O Brasil ocupa a 14<sup>a</sup> posição, superado pelo Chile dentre os países da América Latina (FAO, 2016). Com relação à piscicultura, em 2014, o Brasil produziu 474,33 mil toneladas de peixes, valor 20,9% superior em relação ao ano anterior (IBGE, 2014).

O Brasil apresenta condições excepcionais para a produção de peixes, por possuir condições climáticas favoráveis como: potencial hídrico (cerca de 12% do total de água doce do planeta e aproximadamente 8,5 mil km de costa marítima), produção significativa de grãos para o fabrico de rações, mão de obra relativamente barata, consumo em expansão e, vasta biodiversidade com potencial para cultivo (ABPA, 2014).

Devido ao aumento populacional, a demanda por alimentos cresce de forma acelerada constituindo-se o principal desafio da agropecuária moderna (FAO, 2016; YUE, LIN e LI, 2016). Em face disso, o consumo mundial de peixes aumentou de uma média de 9,9 kg na década de 1960 para aproximadamente 20 kg em 2015. Os principais fatores que contribuíram para este aumento foram o incremento na produção, crescimento populacional e aumento de renda (FAO, 2016).

No Brasil, a oferta de peixes não supre a demanda interna, o que o faz recorrer às importações principalmente da China e Chile (ABPA, 2014), o que ratifica que o Brasil

possui mercado consumidor com grande potencial de crescimento e, portanto, é imperativo expandir a produção piscícola.

### **Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

As tilápias estão distribuídas geograficamente em todos os continentes. Das espécies existentes, a tilápia do Nilo é o segundo peixe de água doce mais cultivado em todo o mundo (YAKUBU et al., 2014). O Brasil, é um dos sete maiores produtores mundial de tilápia. No ano de 2014, a produção nacional foi de aproximadamente 198,49 mil toneladas despescadas, o equivalente a 41,9% do total da piscicultura. A espécie apresentou aumento de 17,3% em relação à produção obtida em 2013 (IBGE, 2014).

A tilápia do Nilo possui muitos atributos que garantem todo seu potencial produtivo, como: taxa de crescimento rápido, elevada resistência e adaptabilidade às condições ambientais adversas, resistência ao estresse e as doenças, fácil reprodução em cativeiro, aceitação de alimentos artificiais (especialmente fontes vegetais) e grande interesse pelo mercado consumidor (devido a carne branca, textura firme e ausência de espinhos intramusculares). Nutricionalmente é importante fonte de proteína e possui baixo teor de lipídios e colesterol (VILA NOVA et al., 2005; EL-SAYED, 2006; FERREIRA et al., 2011; YAKUBU et al., 2014).

Embora a tilapicultura tenha um pacote tecnológico consolidado ou quase consolidado, a ausência de algum nutriente ou substância importante na dieta para promover o desempenho e saúde pode ser a causa da alta incidência de enfermidades ocorrentes nos cultivos. Destas, as mais comuns são, as bacterioses, que limitam a expansão da atividade e causam perdas econômicas significativas (LI et al., 2004; HARIKRISHNAN et al. 2011).

### **Bacteriose por *Aeromonas hydrophila***

A intensificação da aquicultura favorece à promoção de condições propícias ao desenvolvimento de uma série de doenças e problemas relacionados (CYRINO et al., 2010). Os surtos de doenças causam perdas econômicas significativas e apesar de não ser possível quantificar, estima-se em países Asiáticos valores acima de três bilhões de

dólares/ano de prejuízos (KLESIUS e PRIDGEON, 2011). Dentre estas doenças, ressaltam-se as causadas por bactérias, em que *Aeromonas hydrophila* destaca-se dentre as mais patogênicas (BELÉM-COSTA e CYRINO 2006).

*Aeromonas* spp. são bactérias bacilos Gram-negativos, anaeróbias facultativas, não produzem esporos, são móveis, com oxidase positivo, fermentam carboidratos como glicose, maltose, frutose, trealose e são produtoras de ácidos e gás. São oportunistas, comumente isoladas em água potável, alimentos, peixes saudáveis e doentes, podendo causar enfermidades em peixes de água doce e até mesmo noutros vertebrados (incluindo o homem) (ISONHOOD e DRAKE, 2002; SILVA et al., 2010; JANDA e ABBOT 2010).

Manifestam-se em hospedeiros imunossuprimidos ou infectados por outros patógenos. Alguns fatores como inadequada qualidade de água, altas densidades de estocagem, manipulação excessiva, transporte prolongado, lesões mecânicas, poluição orgânica e hipóxia, favorecem o seu aparecimento (MORAES e MARTINS, 2004; FIGUEIREDO e LEAL, 2008).

A infecção por *Aeromonas* spp. normalmente envolve três etapas principais, que primariamente, envolve a fixação e colonização inicial na superfície da pele do hospedeiro, em seguida, ocorre a degradação proteica através de proteases, utilizada como fonte energética, facilitando a multiplicação dos bacilos e, finalmente, a migração para os tecidos mais profundos (JANDA e ABBOT, 2010).

Em peixes, os sinais clínicos podem apresentar-se desde lesões superficiais ou úlceras mais profundas na pele, pontos hemorrágicos na base das nadadeiras, abdômen distendido e exoftalmia (JANDA e ABBOT, 2010). Para colonização e invasão da mucosa do hospedeiro fatores de virulência são observados como exotoxina, enzimas extracelulares a estrutura flagelar, importante na motilidade, associada a presença de biofilmes, geralmente presentes em infecções persistentes (TOMÁS, 2012).

Para o controle das bacterioses, a antibioticoterapia tem sido bastante utilizada, tanto incorporada à ração ou administrada diretamente na água de cultivo. O uso de tais compostos tem se tornado uma medida limitante, visto que causam grande impacto ambiental, através de resíduos químicos tanto na água, quanto nas carcaças de peixes, principal barreira ao comércio internacional, além de possibilitar a seleção de microorganismos resistentes (FIGUEIREDO e LEAL, 2008 ANDRADE et al., 2012).



## Formação de biofilme bacteriano

Biofilme é uma estrutura formada por um conjunto de bactérias que se aderem a um substrato através de propriedades físicas e por substâncias poliméricas extracelulares, as quais podem estar aderidas a superfícies bióticas ou abióticas, e estão envolvidos por uma matriz de polímeros orgânicos e fortemente aderidos por meio de filamentos de origem proteica ou polissacarídeos (COSTERTON et al., 1999; GARRET et al., 2008).

Os biofilmes são constituídos por água, partículas retidas, adsorvidas, dissolvidas e micro-organismos, podendo variar em função das espécies envolvidas, além de macro e micronutrientes que formam substratos sobre os quais os micro-organismos crescem e podem formar um cultivo puro ou se associar a outros micro-organismos (FLEMMING, 1993).

Os biofilmes estão relacionados a resistência às drogas antimicrobianas pelas bactérias (KOZLOVA et al., 2008), considerado um fator de virulência importante observado em bactérias como *Aeromonas* spp. (MERINO et al., 2003). Infecções causadas por bactérias agrupadas em biofilmes, muitas vezes são de difícil tratamento, quando são utilizados antibióticos por si só (WU et al., 2014).

Um importante fator na adesão e formação de biofilme é a presença de flagelos laterais e polares. Tais estruturas são importantes por permitirem que as bactérias se movam para ambientes favoráveis ou evitem aqueles prejudiciais à sua colonização. Além disso, também está relacionado com a patogenicidade de algumas *Aeromonas* spp. (GAVÍN et al., 2002; CANALS et al., 2006).

A formação de biofilme é uma tática de sobrevivência utilizada por micro-organismos em condições adversas no ambiente em que vivem o que causa alteração fenotípica de células de vida livre para a forma denominada sésil (aderidas).

Desse modo, alternativas para tratar infecções causadas por patógenos formadores de biofilme estão entre as novas alternativas para o desenvolvimento de fármacos com ação antibiofilme. Esta ação pode ser direcionada à prevenção, desestabilização da matriz polimérica, enfraquecimento do sistema de comunicação bacteriana (quorum-sensing) ou mesmo a extinção da comunidade microbiana formadora do biofilme (RIBEIRO et al., 2016).

Hipóteses sobre as vantagens ecológicas dos biofilmes incluem proteção contra

desidratação, disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica, aquisição de novas características genéticas, expressão de mecanismos de virulência através da produção de toxinas e resistência aos agentes antimicrobianos (MOSTELLER e BISHOP, 1993; GILBERT et al., 2003; CANALS et al., 2006; ANGELES-MORALES et al., 2012).

Os biofilmes bacterianos possuem papel importante e são caracterizados por sua capacidade de resistência cerca de 10 a 1000 vezes mais aos antimicrobianos e ao sistema imune do hospedeiro (DAVIES, 2003; CLUTTERBUCK et al., 2007).

O uso de diversas substâncias como os OE para o controle de biofilmes se intensificou, por apresentarem ação sobre micro-organismos (NIKOLIĆ, et al., 2014). A interação de substâncias naturais com a superfície celular pode comprometer a etapa inicial de formação do biofilme, além de afetar o sistema de “quorum sensing”, fato este comprovado por alguns estudos (NOSTRO et al., 2007; CHUSRI et al. 2012; SALTA et al. 2013).

### **Uso de antimicrobianos na produção animal**

Os antimicrobianos são substâncias que possuem a capacidade de inibir ou matar micro-organismos (KOHANSKI et al., 2010) e são utilizados na produção animal com intuito terapêutico, profilático ou de promoção de crescimento (RICO et al., 2012).

A utilização de antibióticos em doses subterapêuticas atua como promotor de crescimento por agir na microbiota intestinal, diminuir a competição por nutrientes, obtendo-se maior produtividade pelo aumento da eficiência alimentar, melhorando a saúde e a resistência dos animais às doenças, e conseqüente queda na mortalidade (GONZALES et al., 2012; TORRES et al., 2015).

Por outro lado, esta prática tornou-se um problema mundial, devido a resistência bacteriana, um problema complexo e multifatorial de caráter urgente para a saúde pública, e que já existe uma dependência na utilização de tais produtos na produção animal. Estudos apontaram uma relação direta entre o uso de antibióticos e o surgimento de resistência a antibióticos em patógenos humanos e animais (TEUBER, 1999; VAN DEN BOGAARD et al., 2002). Nesse sentido, para diminuir riscos associados ao uso destes compostos, algumas medidas foram tomadas. A partir de 2006, os antibióticos foram banidos pela União Europeia. A Coreia do Sul também os proibiu a partir do segundo

semestre de 2011 (LEE et al., 2014). No Brasil, a utilização de antimicrobianos em aquicultura necessita de prescrição (MARON et al., 2013), entretanto, são utilizados de forma indiscriminada sem as recomendações técnicas especializadas (GASTALHO et al., 2014), mas para Torres et al. (2015) estas proibições acarretariam em prejuízos à produção animal.

Com tais restrições, a intensificação na utilização de aditivos naturais como os OE com funções antimicrobianas, antioxidantes, estimulantes imunológico e melhoradores do desempenho representam uma alternativa viável para utilização como promotores de crescimento.

### **Uso de óleos essenciais na piscicultura**

Diversos fatores podem afetar o bem-estar dos peixes em estações de piscicultura, como manejo, transporte e, principalmente, altas densidades de estocagem, que ampliam as interações comportamentais. Essas interações podem provocar estresse e ocasionar doenças. A redução de fatores estressores seja no cultivo, seja em operações de manejo, é a chave para fornecer condições que promovam melhora no bem-estar dos peixes (BRITO et al., 2015).

A utilização de alimentos funcionais é uma alternativa viável, pois são capazes de fortalecer o sistema imunológico e auxiliar na prevenção e até no controle de algumas doenças (BRICKNELL e DALMO 2005). Neste sentido, os produtos naturais estão em franca expansão pela facilidade de obtenção e pelo seu baixo custo, e o Brasil insere-se neste mercado devido à sua vasta biodiversidade, podendo contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos (CALIXTO, 2003).

O uso de fitoterápicos na piscicultura vem ganhando espaço, porque produtos à base de plantas são econômicos, biodegradáveis e possuem efeitos colaterais mínimos (MADHURI et al., 2012; CHRISTAKI et al., 2012). Estudos tem revelado que os OE ou seus constituintes podem ser usados com sucesso em nutrição de peixes. Sutili et al. (2015), constataram atividade “*in vitro*” do OE de *L. alba* contra *Aeromonas* spp. No ensaio “*in vivo*”, a sobrevivência foi elevada em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) tratados após desafio com *Aeromonas* spp. Shehata et al. (2013) observaram aumento na taxa de crescimento e consumo de ração com OE de tomilho em tilápia do Nilo. Em bagre

do canal, componentes ativos do OE de orégano atuaram como promotor de crescimento e melhoraram a resistência às doenças (ZHENG et al., 2009)

O potencial antimicrobiano dos OE de *L. alba* e *A. triphylla*, embora já avaliados em estudos *in vitro* com *Aeromonas* spp., (PARODI et al., 2013; MACHADO et al., 2014) ainda são limitados na dieta de peixes, e seus benefícios sobre o desempenho, parâmetros metabólicos e imunológicos são pouco elucidados.

### **Óleos essenciais e mecanismos de ação**

Os OE são misturas complexas, voláteis, geradores de sabores e/ ou aromas. Podem ser extraídos de diversas partes da planta como brotos, folhas, cascas, raízes, flores, frutos e sementes, apresentando-se fisicamente líquidos em temperatura ambiente, de cor clara ou incolor e de característica lipofílica (TROMBETTA et al., 2005; SILVA et al., 2012).

Os OE são utilizados na indústria farmacêutica com fins medicinais, por meio da presença de compostos biologicamente ativos, com propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antiparasitárias, antifúngicas e anti-inflamatórias. Além disso, têm sido utilizados como aditivos nas dietas para animais, principalmente como promotores de crescimento e reforçadores do sistema imune (TIPU et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2008; CHRISTAKI et al., 2012; ACAR et al., 2015).

Os aditivos fitogênicos são representados por diversas ervas, especiarias, extrato de plantas e OE. Destes, os OE são tidos como os mais complexos e suas atividades as menos conhecidas (KIM et al., 2008). As propriedades bacteriostáticas, bactericidas, e fungicidas “*in vitro*” a partir de produtos naturais, têm sido comprovadas através de recentes pesquisas (SILVA et al., 2012b; RADAELI et al., 2016; REHAB et al., 2016). Contudo o mecanismo de ação ainda é pouco compreendido pois depende do tipo de OE e de seus componentes majoritários. De modo geral, os mecanismos de ação incluem danos à membrana externa, alterações da permeabilidade celular, danos às proteínas de membrana, inibição da síntese ou danos nos ácidos nucleicos (PELCZAR, et al., 1980; FRUTUOSO et al., 2013). Todas essas alterações fisiológicas podem causar lise celular e consequente morte bacteriana (PATRA e BAEK, 2016).

As bactérias Gram negativas são menos susceptíveis aos antimicrobianos, devido

à sua camada de lipopolissacarídeos. Entretanto, acredita-se que devido a sua hidrofobicidade, os OE podem afetar os ácidos graxos insaturados, modular a membrana celular bacteriana e causar alterações em sua estrutura (BAKKALI et al., 2008)

Para os OE, os possíveis mecanismos de ação podem ser devido ao estímulo nos processos digestórios pelo aumento na atividade de enzimas digestivas, com aumento na digestibilidade e consequente absorção dos nutrientes pelo epitélio intestinal, alterações na microbiota intestinal, além dos efeitos antimicrobiano e imunomodulador (VIDANARACHCHI et al., 2005; RIZZO et al., 2008).

A administração contínua dos imunoestimulantes pode tornar o sistema imune tolerante e causar imunossupressão, mas se fornecidos por curtos períodos, pode estimulá-lo, sendo mais indicados em condições ambientais adversas, ou quando os peixes são submetidos a fatores estressores, como manipulações, transporte etc (BRICKNELL e DALMO 2005; SAKAI, 1999). Dessa forma, a utilização de OE que possuam atividade antimicrobiana, antioxidante ou imunomoduladora, é uma estratégia viável na aquicultura (SYAHIDAH et al., 2015).

### ***Lippia alba***

*Lippia alba* é encontrada em diversas regiões brasileiras sob diferentes denominações: erva-cidreira, falsa-melissa, chá-de-tabuleiro, erva cidreira-do-campo, salva-do-Brasil, salva-limão e erva-cidreira-brava, alecrim-do-mato dentre outras (MATOS, 2000; JANNUZZI et al., 2007). Uma das grandes vantagens da *L. alba* está relacionada a sua capacidade de colonização e crescimento rápido, sendo encontrada em diversas regiões (YAMAMOTO et al., 2008).

Em geral o gênero é bastante utilizado na medicina popular e apresenta atividade farmacológica contra problemas gastrointestinais, respiratórios e imunológicos (PASCUAL et al., 2001). Na piscicultura, estudos demonstraram a eficácia de *L. alba* em jundiá e tilápia do Nilo para sedação e anestesia (HOHLENWERGER et al., 2016; DANIEL et al., 2016) e em tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*) e tilápia do Nilo como redutor de estresse (SENA et al., 2016; HOHLENWERGER et al., 2017). Verificou-se ainda, atividade antioxidante para os períodos de hipóxia e hiperóxia durante o transporte de jundiá, melhorando o bem-estar

dos animais e a qualidade do filé para o consumo (AZAMBUJA et al., 2011).

Plantas e ervas medicinais estão sendo bastante utilizadas na dieta de peixes como promotores de crescimento (TIPU et al. 2006), contudo, os trabalhos com *L. alba* na dieta de peixes ainda são escassos. Saccol et al. (2013) adicionaram níveis do OE na dieta de jundiás e observaram diminuição na peroxidação lipídica e aumento nas reservas de glicogênio.

### *Aloysia triphylla*

*Aloysia triphylla* pertence à família Verbenaceae e cresce naturalmente na América do Sul, sendo bastante cultivada no Sul do Brasil. Conhecida popularmente como erva-lúisa, cidrão, dentre outros (CARNAT et al., 1999; KOUHILA et al., 2000; DÍAZ et al., 2007; CRESTANI et al., 2012), é tradicionalmente utilizada na medicina popular para o tratamento de insônia, ansiedade, analgésica e sedativa (VALENTÃO et al., 2002), como aromatizante de ambientes e na culinária (LORENZI e MATOS, 2008).

A composição do OE de *A. triphylla* já é alvo de diversas pesquisas. Crestani et al. (2012) identificaram 27 componentes no OE de *A. triphylla*, destes, os majoritários foram respectivamente limoneno, neral, geranial e óxido de cariofileno.

O OE de *A. triphylla* destaca-se ainda pelo seu potencial antimicrobiano contra *A. hydrophila* (PARODI et al., 2013), redução de estresse e promoção de crescimento em jundiá (ZEPPENFELD, et al., 2014; 2015) e efeito anestésico em robalo-peva (*Centropomus parallelus*) e tilápia do Nilo (PARODI et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2016). Também demonstrou propriedade na melhoria da conservação de filés de jundiá (DANIEL et al., 2014).

## REFERÊNCIAS

- ABPA - 1º ANUÁRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2014. Disponível em: [http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520\\_218117.pdf](http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf). Acesso em: 18.05.2016.
- ACAR, U.; KESBIÇ, O.S.; YILMAZ, S.; GÜLTEPE, N.; TÜRKER, A. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, v. 437, p. 282-286, 2015.
- AHIRRAO, S.D.; SURYAWANSHI, S.P. Antibiotic study of *Zingiber officinale* extract against *Pseudomonas aeruginosa* and standardization with some commercial antibiotics Co-trimoxazole and Imperem. **International Journal of Scientific Research**, v. 5, p.121-122, 2016.
- ANDRADE, N.P.C.; SILVA, E.M.S.; MOTA, R.A.; VESCHI, J.L.A.; RIBEIRO, M.F.; KREWER, C. C.; COSTA M.M. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 79, p. 9-15, 2012
- ANGELES-MORALES, E.B.; MONDRAGÓN-FLORES, R.; LUNA-ARIAS, J.P.; ENRÍQUEZ-NIETO, C.T.; PARRA-ORTEGA, B.; CASTRO-ESCARPULLI, G. Evaluation of morphological changes of *Aeromonas caviae* Sch3 biofilm formation under optimal conditions. **Advances in Microbiology**, v. 2, p. 552-560, 2012.
- AZAMBUJA, C.R.; MATTIAZZI, J.; RIFFEL, A.P.K.; FINAMOR, I.A.; GARCIA, L.O.; HELDWEIN, C.G.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M.A.; LLESUY, S.F. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, v. 319, p. 156-161, 2011.

- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological Effects of Essential Oils – A Review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BASHA, K.A.; RAMAN, R.P.; PRASAD, K.P.; KUMAR, K.; NILAVAN, E.; KUMAR, S. Effect of dietary supplemented andrographolide on growth, non-specific immune parameters and resistance against *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* (Hamilton). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, p. 1433-1441, 2013.
- BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, v. 63, p. 281-284, 2006.
- BOYD, C.E.; LI, L. Intensity of Freshwater Use for Aquaculture in Different Countries. In: International Symposium on tilapia in aquaculture. Shanghai Ocean University, Shanghai, China, 22-24 april 2011. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/250308984\\_Why\\_tilapia\\_is\\_becoming\\_the\\_most\\_important\\_food\\_fish\\_on\\_the\\_planet](https://www.researchgate.net/publication/250308984_Why_tilapia_is_becoming_the_most_important_food_fish_on_the_planet). Acesso em: 05.12.2016.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R. The Use of Immunostimulants in fish larval Aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, p. 457–472, 2005.
- BRITO, J.M.; FERREIRA, A.H.C.; SANTANA JÚNIOR, H.A.; NASCIMENTO, A.S.; FREITAS, L.O.; SANTOS, C.H.L.; SILVA, B.R.; BATISTA, J.M.M.; SANTOS, G.L.; OLIVEIRA, L.T.S. Enriquecimento ambiental na piscicultura - Ambiente, bem estar, piscicultura, produtividade. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 12, p. 4260-4267, 2015.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 37-39, 2003.
- CANALS, R.; RAMIREZ, S.; VILCHES, S.; HORSBURGH, G.; SHAW, J. G.; TOMAS, J. M.; MERINO, S. Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*.



**Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 542-555, 2006.

CARNAT, A.; CARNAT, A. P.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J. L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. **Fitoterapia**, v. 70, p. 44-49, 1999.

CASTRO, S.B.R.; LEAL, C.A.G.; FREIRE, F.R.; CARVALHO, D.A.; OLIVEIRA, D.F.; FIGUEIREDO, H.C.P. Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 756-760, 2008.

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 156-160, 2004.

CHUSRI, S; NA PHATTHALUNG, P; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Anti-biofilm activity of *Quercus infectoria* G. Olivier against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, p. 511-517, 2012.

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, Á. J. de A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R.; DAIRIK, J. K.; OTHERS. A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 68-87, 2010.

CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.1-17, 2007.

COSTERTON, J. W.; STEWART, PHILIP S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. **Science Magazine**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CREPALDI, D.V.; FARIA, P.M.C.; TEIXEIRA, E.A.; RIBEIRO, L.P.; COSTA, A.A.P.; MELO, D.C.; CINTRA, A.P.R.; PRADO, S.A.; COSTA, F.A.A.; DRUMOND, M.L.; LOPES, V.E.; MORAES, V.E. A situação da aquacultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, p.81-85, 2006.

CRESTANI, L.; MANICA, V.; CHIARADIA, V.; PUTON, B. M. S.; PAROUL, N.; CANSIAN, R. L. Caracterização química e atividade antibacteriana do óleo essencial de erva-luísia (*Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton). **Perspectiva**, v.36, p.53-63, 2012.

CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. **Agriculture**, v. 2, p. 228-243, 2012.

CUNHA, M.A.; de BARROS, C.M.F.; GARCIA, L.O.; VEEK, A.P.L.; HEINZMANN, B.M. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, p. 403-406, 2010.

DANIEL, A. P.; VEECK, A. P. L.; KLEIN, B.; FERREIRA, L. F.; DA CUNHA, M. A.; PARODI, T. V.; ZEPPENFELD, C. C.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; EMANUELLI, T. Using the essential oil of *Aloysia Triphylla* (L'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage. **Journal of Food Science**, v. 79, p. 1205-1211, 2014.

DANIEL, A. P.; FERREIRA, L. F.; KLEIN, B.; RUVIARO, A. R.; QUATRIN, A.; PARODI, T. V.; ZEPPENFELD, C. C.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; EMANUELLI, T. Oxidative stability during frozen storage of fillets from silver catfish (*Rhamdia quelen*) sedated with the essential oil of *Aloysia triphylla* during transport. **Ciência Rural**, v. 46, p. 560-566, 2016.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p.114-122, 2003.

DÍAZ, O. L.; DURÁNG, D. C.; MARTÍNEZ, J. R.; STASHENKO, E. Estudio comparativo de la composición química de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* L' Hér Britton cultivada en diferentes regiones de Colombia. **Scientia et Technica**, v. 1, p. 351-353, 2007.

EL-SAYED, A.F.M. **Tilápia Culture**. London: Cabi. 2006. 277p.

FAO. 2016. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.

FERREIRA, P. M. F.; BARBOSA, J. M.; SANTOS, E. L.; SOUZA, R. N.; SOUZA, S.R. Avaliação do consumo de oxigênio da tilápia do Nilo submetidas a diferentes estressores. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 6, p. 56-62, 2011.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.

FIGUEIREDO, R.O.; STEFANINI, M.B.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M.; FACANALI, R. Essential oil composition of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton leaves cultivated in Botucatu, São Paulo, Brazil. **Acta Horticulturae**, v.629, p. 131-134, 2004.

FLEMMING, H.C. Biofilms and environmental protection. **Water Science Technology**, v.27, p.1-10, 1993.

FRUTUOSO, A. E.; NASCIMENTO, N. T. do; LEMOS, T. L. G. de; COELHO, E. L.; TEIXEIRA, D.M.A. Essential oils applied in food: a review. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 4, p. 69-81, 2013.

GARRET, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilm on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, p. 1049-1056, 2008.

GASTALHO, S.; SILVA, G.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, p. 29-45, 2014.

GAVÍN, R.; RABAAN, A. A.; MERINO, S.; TOMÁS, J. M.; GRYLLOS, I.; SHAW, J. G. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and

biofilm formation. **Molecular microbiology**, v. 43, p. 383-397, 2002.

GILBERT, P.; MC BAIN, A.J.; RICKARD, A.H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. International **Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, 245-248, 2003.

GONZALES, E.; MELLO, H.H.C.; CAFÉ, M.B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, v. 13, p. 48-53, 2012.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M-S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture**, v.317, p.1-15, 2011.

HASSAAN, M.S.; A SOLTAN, M. Evaluation of Essential oil of fennel and garlic separately or combined with bacillus licheniformis on the growth, feeding behaviour, hemato-biochemical indices of *Oreochromis niloticus* (L.) Fry. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v.7, p. 1-8, 2016.

HOHLENWERGER, J.C.; EDUARDO COPATTI, C.; CEDRAZ SENA, A.; DAVID COUTO, R.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D. Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 49, p. 119-126, 2016.

HOHLENWERGER, J.C.; BALDISSEROTTO, B.; COUTO, R.D.; HEINZMANN, B.M.; SILVA, D.T.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. **Ciência Rural**, v. 47, p. 1-4; 2017.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. PAS - **Pesquisa Anual de Serviços. Produção da Pecuária Municipal 2014.**

AGRICULTURA, M. D. Rio de Janeiro. 1: 197 [Online] Disponível em:

[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2014\\_v42\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf). Acesso

em 10-06-2016.

IBRAHEM, M.D.; FATHI, M.; MESALHY, S.; ABD EL-ATY, A.M. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish Shellfish Immunology**, v.29, p. 241-246, 2010.

ISONHOOD, J.H.; DRAKE, M. *Aeromonas* species in food. **Journal food Protection**, v.65, p. 575-582, 2002.

JAFRI, H.; HUSAIN, F. M.; AHMAD, I. Antibacterial and antibiofilm activity of some essential oils and compounds against clinical strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical and Therapeutic Sciences**, v. 1, p. 65-71, 2014.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J.K.A.; SILVA, D.B.; GRACINDO, L.A.M.; VIEIRA, R.F. Avaliação agrônômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.258-264, 2011.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 813-829, 2003.

KARÁSKOVÁ, K.; SUCHÝ, P.; STRAKOVÁ, E. Current use of phytogenic feed additives in animal nutrition: a review. **Czech Journal of Animal Science**, v. 60, p. 521-530, 2016.

KIM, S. W.; FAN, M. Z.; APPLGATE, T. J. Nonruminant nutrition symposium on natural phytobiotics for health of young animals and poultry: mechanisms and application. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 138-139, 2007.

KLESZIUS, P.; PRIDGEON, J. **Live Attenuated Bacterial Vaccines in Aquaculture**. In: International Symposium on tilapia in aquaculture. Shanghai Ocean University,

Shanghai, China, 22-24 april 2011. Disponível em:

[www.researchgate.net/publication/250308984\\_Why\\_tilapia\\_is\\_becoming\\_the\\_most\\_important\\_food\\_fish\\_on\\_the\\_planet](http://www.researchgate.net/publication/250308984_Why_tilapia_is_becoming_the_most_important_food_fish_on_the_planet). Acesso em: 05.12.2016.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 423-435, 2010.

KOUHILA, M.; BELGHIT, A.; DAGUENET, M.; BOUTALEB, B. C. Experimental determination of the sorption isotherms of mint (*Mentha viridis*), sage (*Salvia officinalis*) and verbena (*Lippia citriodora*). **Journal of Food Engineering**, v. 47, p. 281-287, 2001.

KOZLOVA, E. V.; POPOV, V. L.; SHA, S.; FOLTZ, S. M.; EROVA, T. E.; AGAR, S. L.; HORNEMAN, A. J.; CHOPRA, A. K. Mutationkozlova in the S-ribosylhomocysteinase (luxS) gene involved in quorum sensing affects biofilm formation and virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 343-354, 2008.

LEE, J.H.; CHO, S.; PAIK, H.D.; CHOI, C.W.; NAM, K.T.; HWANG, S.G.; KIM, S. K. Investigation on antibacterial and antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of some thai edible plants as an alternative for antibiotics. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, p. 1461-1468, 2014.

LI, P.; LEWIS, D.H.; GATLIN, D.M. Dietary Oligonucleotides from Yeast RNA Influence Immune Responses and Resistance of Hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* Infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 561-569, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2.ed. Nova Odessa: **Plantarum**, 2008. 544p.

MACHADO, T. F.; PEREIRA, R. de C. A.; BATISTA, V. C. V. Seasonal variability of

the antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia alba*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 515-519, 2014.

MADHURI, S.; SAHNI, Y.P.; PANDEY, G. Herbal feed supplement as drugs and growth promoter to fishes. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, p. 30-33, 2012.

MAJOLO, C.; DA ROCHA, S.I.B.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C. M.; BIZZO, H.R. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, 2016. Online. Available from: <doi:10.1111/are.13073>. Acesso em: 04.12.2016.

MARON, D.F.; SMITH, T.J.; NACHMAN, K.E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. **Globalization and health**, v. 9, p. 1-11, 2013.

MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000. 346 p.

MERINO, S.; GAVÍN, R.; VILCHES, S.; SHAW, J; TOMÁS, J. M. A colonization factor (production of lateral flagella) of mesophilic *Aeromonas* spp. Is inactive in *Aeromonas salmonicida* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p. 663-667, 2003.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. **Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva**. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva, São Paulo: TecArt, p.343-383, 2004.

MOSTELLER, T.M., BISHOP, J.R., Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v.56, p.34-41, 1993.

- NIKOLIĆ, M.; VASIĆ, S.; DURĐEVIĆ, J.; STEFANOVIĆ, O.; ČOMIĆ, L.  
Antibacterial and anti-biofilm activity of ginger (*Zingiber officinale* (Roscoe)) ethanolic extract. **Kragujevac Journal of Science**, v. 36, p. 129-136, 2014.
- NOSTRO, A.; PROCOPIO, F.; PIZZIMENTI, F.C.; CANNATELLI, M.A.;  
BISIGNANO, G.; MARINO, A.; BLANCO, A.R.; CIONI, P. L.; ROCCARO, A.S.  
Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519-523, 2007.
- PARODI, T.V.; VARGAS, A.P.C.; KREWER, C.; FLORES, E.M.M.;  
BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; OLIVEIRA, J.V.; POPIOLSKI, A.S.;  
MINOZZO, M. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO<sub>2</sub> extraction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, p. 283-292, 2013.
- PARODI, T.V.; SANTOS, C.A.; VERONEZ, A.; GOMES, L.C.; HEINZMANN, B.  
M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction and recovery time of *Centropomus parallelus* exposed to the essential oil of *Aloysia triphylla*. **Ciência Rural**, v. 46, p. 2142-2147, 2016.
- PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E; SÁNCHEZ MATA, D.;  
VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethno pharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.
- PATRA, J.; BAEK, K.-H. Antibacterial activity and action mechanism of the essential oil from *Enteromorpha linza* L. against foodborne pathogenic bacteria. **Molecules**, v. 21, p. 1-11, 2016.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980.



RADAELLI, M.; DA SILVA, B.P.; WEIDLICH, L.; HOEHNE, L.; FLACH, A.; DA COSTA, L.A.M.A.; ETHUR, E.M. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 424-430, 2016.

REHAB, M.A. E.-B.; ZEINAB, S.H. Eugenol and linalool: Comparison of their antibacterial and antifungal activities. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, p. 1860-1872, 2016.

RIBEIRO S.M.; FELÍCIO, M.R.; BOAS, E.V.; GONÇALVES, S.; COSTA, F.F.; SAMY, R.P.; SANTOS, N.C.; FRANCO, O.L. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v.160, p.133-144, 2016.

RICO, A.; SATAPORNVANIT, K.; HAQUE, M.M.; MIN, J.; NGUYEN, P.T.; TELFER, T.C.; VAN DEN BRINK, P.J. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review: Environmental risks of Asian aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, p. 75-93, 2012.

RIZZO, P. V.; MENTEN, J. F. M.; RACANICCI, A. M. C.; SANTAROSA, J. Foundation and perspectives of the use of plant extracts as performance enhancers in broilers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 10, p. 195-204, 2008.

SACCOL, E.M.H.; UCZAY, J.; PÊS, T.S.; FINAMOR, I.A.; OURIQUE, G.M.; RIFFEL, A.P.K.; SCHMIDT, D.; CARON, B.O.; HEINZMANN, B.M.; LLESUY, S.F.; LAZZARI, R.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M.A. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416-417, p. 244-254, 2013.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92, 1999.

SALTA, M.; WHARTON, J.A.; DENNINGTON, S.P.; STOODLEY, P.; STOKES, K.R. performance of three natural products against initial bacterial attachment.

**International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 21757-21780, 2013.

SANTURIO, D.F.; COSTA, M.M.; MABONI, G.; CAVALHEIRO, C.P.; SÁ, M. F.; POZZO, M. D.; ALVES, S. H.; FRIES, L. L. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1051-1056, 2011.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 431-437, 2001.

SENA, A.C.; TEIXEIRA, R.R.; FERREIRA, E.L.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D.; COUTO, R.D.; COPATTI, C.E. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 465, p. 374-379, 2016.

SHEHATA, S.A.; MOHAMED, M.S.; ABD EL-SHAFI, S. Antibacterial activity of essential oils and their effects on Nile tilapia fingerlings performance. **Journal of Medical Science**, v.13, p. 367-372, 2013.

SILVA, R.M.L.; ROSSI JUNIOR, O.D.; COSTA, F.N.; CHAVES, N.P.; NASCIMENTO, D.L.; KAMIMURA, B.A. *Aeromonas* spp. em água de pisciculturas da região da baixada ocidental maranhense. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.36, p. 245-249, 2010.

SILVA, L.L.; PARODI, T.V.; RECKZIEGEL, P.; GARCIA, V.O.; BÜRGER, M.E.; BALDISSEROTTO, B.; MALMANN, C.A.; PEREIRA, A.M.S.; HEINZMANN, B. M. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 350-353, p. 91-97, 2012.

SILVA, F. C.; CHALFOUN, S. M.; SIQUEIRA, V. M. de; BOTELHO, D. M. dos S.; LIMA, N.; BATISTA, L. R. Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially mycotoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1002-1010, 2012b.

SOLTANI, M.; N, SHEIKHZADEH, H.A.; EBRAHIMZADEH-MOUSAVI, H.A.; ZARGAR, A. Effects of *Zataria multiflora* essential oil on innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v.5, p. 191-199, 2010.

STOLKER, A.A.M.; BRINKMAN, U.A.TH. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - A review. **Journal of Chromatography A.**, v. 1067, p. 15-53, 2005.

SUTILI, F.J.; SLIMA SILVA, L.; GRESSLER, L.T.; BATTISTI, E.K.; HEINZMANN, B.M. VARGAS, A.C.; BALDISSEROTTO, B. Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: *in vitro* activity and their use in experimentally infected fish. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, p.47-54, 2015.

SUTILI, F. J.; MURARI, A. L.; SILVA, L. L.; GRESSLER, L. T.; HEINZMANN, B. M.; DE VARGAS, A. C.; SCHMIDT, D.; BALDISSEROTTO, B. the use of *Ocimum americanum* essential oil against the pathogens *Aeromonas hydrophila* and *gyrodactylus* sp. in silver catfish (I). **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 82-88, 2016.

SYAHIDAH, A.; SAAD, C. R.; DAUD, H. M.; ABDELHADI, Y. M. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 14, p. 27-44, 2015.

TEIXEIRA, R. R.; DE SOUZA, R. C.; SENA, A. C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M.; COUTO, R. D.; COPATTI, C. E. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: Anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research**, 2016. Online. Available from:

<<http://dx.doi.org/10.1111/are.13165>>. Acesso em 20.8.2016 doi: 10.1111/are.13165.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 56, p. 755-763, 1999.

TORRES, R.N.S.; DREHER, A.; SIMIONI, T. A. Uso de antibióticos como promotor de crescimento e seus possíveis substitutos ao seu uso em frangos de corte. **Nutritime Revista Eletrônica**, v.12, p.4348-4358, 2015.

TIPU, M. A.; AKHTAR, M. S.; ANJUM, M. I.; RAJA, M. L.; OTHERS. New dimension of medicinal plants as animal feed. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 26, p. 144-148, 2006.

TOMÁS, J. M. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 1-22, 2012.

VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; DE LOURDES BASTOS, M. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1324-1327, 2002.

VAN DEN BOGAARD, A.E.; WILLEMS, R.; LONDON, N.; TOP, J.; STOBBERINGH, E.E. Antibiotic resistance of fecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 497-505, 2002.

VIDANARACHCHI, J. K.; MIKKELSEN, L. L.; SIMS, I.; IJI, P. A.; CHOCT, M. Phytobiotics: alternatives to antibiotic growth promoters in monogastric animal feeds. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**, v. 15, p. 131-144, 2005.

VILA NOVA, C.M.V.M.; GODOY, H.T.; ALDRIGUE, M.L. Composição química,

teor de colesterol, e caracterização dos lipídios totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e Pargo (*Lutjanus purpureus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 430-436, 2005.

WU, H.; MOSER, C.; WANG, H.Z.; NIELS HØIBY, N.; SONG, Z.J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v.7, p.1-7, 2014.

YAMAMOTO, P. Y.; COLOMBO, C. A.; AZEVEDO FILHO, J. A.; LOURENÇÃO, A. L.; MARQUES, M. O. M.; MORAIS, G. D. S.; CHIORATO, A. F.; MARTINS, A. L. M.; SIQUEIRA, W. J. Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 481-489, 2008.

YAKUBU, A. F.; NWOGU, N. A.; APOCHI, J. O.; OLAJI, E. D.; ADAMS, T. E. Economic profitability of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1757) in semi flow through culture system. **Journal of Aquatic Science**, v. 2, p. 1-4, 2014.

YUE, G.; LIN, H.; LI, J. Tilapia is the fish for next-generation aquaculture. **International Journal Marine Science Ocean Technology**, v. 3, p. 11-13, 2016.

ZENG, Z.; ZHANG, S.; WANG, H.; PIAO, X. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: A review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, p. 2-10, 2015.

ZEPPENFELD, C. C.; TONI, C.; BECKER, A. G.; MIRON, D. S.; PARODI, T. V.; HEINZMANN, B. M.; BARCELLOS, L. J. G.; KOAKOSKI, G.; ROSA, J. G. S.; LORO, V. L.; CUNHA, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture**, v. 418 - 419, p. 101 - 107, 2014.

ZEPPENFELD, C. C.; HERNÁNDEZ, D. R.; SANTINÓN, J. J.; HEINZMANN, B. M.; DA CUNHA, M. A.; SCHMIDT, D.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Aloysia*

*triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*).  
**Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 933-940, 2015.

ZHENG, Z.L.; TAN, J.Y.W.; LIU, H.Y. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, p. 105-115, 2009

## CAPÍTULO 1

---

**Atividade antimicrobiana e sinérgica dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* e *Lippia alba* em *Aeromonas* spp.**

**Atividade antimicrobiana e sinérgica dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* e *Lippia alba* em *Aeromonas* spp.**

**RESUMO**

A crescente preocupação com a resistência bacteriana e a restrição ao uso de antibióticos promotores de crescimento tem estimulado a busca por produtos naturais com atividade antimicrobiana e como adjuvantes de antibióticos sintéticos em patógenos de interesse na piscicultura. Objetivou-se com este trabalho identificar e quantificar os constituintes químicos e avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* (OEAT) e *Lippia alba* (OELA), bem como a atividade antibiofilme e sinérgica com o florfenicol sobre isolados de *Aeromonas* spp. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da microdiluição em caldo pela concentração bactericida mínima (CBM) em 28 isolados de *Aeromonas* spp. A formação do biofilme foi avaliada em 21 isolados. Para a atividade sinérgica de OEAT e OELA com o florfenicol utilizou-se a técnica do “checkerboard”. Os principais constituintes de OEAT foram  $\alpha$ -citral (39,91%), E-carveol (25,36%) e limoneno (21,52%) e, em OELA; linalool (81,64%) foi o constituinte mais abundante. Os isolados avaliados apresentaram susceptibilidade aos dois óleos essenciais com CBM entre 195,31 e 3125  $\mu$ L/mL. Com relação à produção de biofilme, 2 isolados foram classificados como não produtores, 3 como moderados e 16 como fraco produtores. Os óleos essenciais interferiram no biofilme na etapa inicial de formação, passando de moderados a fraco produtores, entretanto em biofilme consolidado, estes não causaram interferência. Os OEAT e OELA combinados com o florfenicol reduziram a CBM e o índice da concentração inibitória variou de 0,09 a 0,49, demonstrando efeito sinérgico. Conclui-se que os óleos essenciais testados possuem atividade antimicrobiana frente a *Aeromonas* spp., interferem na etapa inicial de formação de biofilme e quando combinados com o florfenicol, apresentaram efeito sinérgico por meio da redução na dose mínima do antibiótico.

**Palavras-chave:** adjuvantes antibióticos, antibiofilme, concentração bactericida mínima, florfenicol.



**Antimicrobial and synergistic activity of the essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* in *Aeromonas* spp.**

**ABSTRACT**

Increasing concern about bacterial resistance and the restriction of the use of antibiotics for growth promotion has stimulated the search for natural products with antimicrobial activity and as adjuvants of synthetic antibiotics in pathogens of interest in fish farming. The objective of this work was to identify and quantify the chemical constituents and to evaluate the antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (EOAT) and *Lippia alba* (EOLA) essential oils, as well as the antibiofilm and synergistic activity with florfenicol on *Aeromonas* spp. The antimicrobial activity was evaluated through broth microdilution by minimum bactericidal concentration (MBC) in 28 isolates of *Aeromonas* spp. Biofilm formation was evaluated in 21 isolates. For the synergistic activity of EOAT and EOLA with florfenicol, the checkerboard technique was used. The main constituents of EOAT were  $\alpha$ -citral (39.91%), E-carveol (25.36%) and limonene (21.52%) and, in EOLA; Linalool (81.64%) was the most abundant constituent. The evaluated isolates presented susceptibility to two essential oils with MBC between 195.31 and 3125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Regarding the production of biofilms, 2 isolates were classified as non-producers, 3 as moderates and 16 as non-producers. The essential oils interfered in the biofilm in the initial stage of formation, from moderate to weak producers, however in consolidated biofilm, they did not cause interference. EOAT and EOLA combined with florfenicol resulted deresead MBC and the inhibitory concentration index ranged from 0.09 to 0.49, demonstrating a synergistic effect. It is concluded that the essential oils tested have an antimicrobial activity against *Aeromonas* spp., Interfere in the initial stage of biofilm formation and when combined with florfenicol, showed a synergic effect by reducing the minimum dose of the antibiotic.

**Key words:** adjuvants antibiotics, antibiofilm, minimum bactericidal concentration, florfenicol

## INTRODUÇÃO

O aumento da resistência de micro-organismos patogênicos a múltiplas drogas é reconhecidamente um problema de saúde global (CHONG et al., 2011). Neste sentido, é crescente a política de banimento do uso de antibióticos promotores de crescimento na produção animal em muitos países, devido a efeitos adversos em função do seu efeito residual na carne e risco ambiental (SCHWARZ et al., 2001; STOLKER e BRINKMAN, 2005; AHIRRAO e SURYAWANSHI, 2016). A utilização de produtos antimicrobianos naturais vêm sendo cada vez mais realizados visando solucionar a problemática da resistência microbiana e as bacterioses como *Aeromonas* spp. que causam perdas econômicas substanciais na piscicultura (GIRI et al., 2015; KARÁSKOVÁ et al., 2016).

Em decorrência disto, os óleos essenciais apresentam-se como alternativa viável, não só para substituir ou agir sinergicamente com antibióticos, mas também para a inibição da formação de biofilme (KIM et al., 2016). Esta é uma tática de sobrevivência utilizada por micro-organismos em condições adversas no ambiente em que vivem, e tem como vantagens a proteção contra desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência aos agentes antimicrobianos (MOSTELLER e BISHOP, 1993; GILBERT et al., 2003), o que pode tornar os tratamentos com antibióticos ineficazes, pois sua resistência é cerca de 10 a 1000 vezes (DAVIES, 2003; CLUTTERBUCK et al., 2007).

Os óleos essenciais podem agir em sinergia com antibióticos sintéticos, para potencializar os efeitos contra micro-organismos patogênicos importantes na piscicultura. Além de contribuir para reduzir ou evitar a dependência ao uso de antibióticos como princípio terapêutico e promotor de crescimento em peixes.

Pesquisas que envolvam a utilização de óleos essenciais se justificam uma vez que produtos à base de plantas são biodegradáveis, bem aceitos pela população e possuem efeitos colaterais mínimos ou inexistentes (CHRISTAKI et al., 2012; MADHURI et al., 2012; NABRDALIK e GRATA, 2016).

Dentre as atividades biológicas observadas nos óleos essenciais destacam-se a sua ação antimicrobiana (RIBEIRO et al., 2013; STARLIPE et al., 2013), imunológica (ACAR et al., 2014), anestésica (SENA et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2016) redutora de estresse (SENA et al., 2016; HOHLENWERGER et al., 2016) e promotora de crescimento em peixes (ZHENG et al., 2009; ACAR et al., 2014; ZEPPENFELD et al.,

2015; WIGRAIBOON et al., 2016).

Os óleos essenciais de *Aloysia triphylla* (OEAT) e *Lippia alba* (OELA) podem ser agentes potenciais aos antimicrobianos tradicionais. Assim, o presente trabalho teve por objetivo identificar os componentes químicos do OEAT e OELA, bem como avaliar seus potenciais biocida, antibiofilme e sinérgico combinado com o antibiótico florfenicol em *Aeromonas* spp.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Óleos essenciais

As plantas *L. alba* e *A. triphylla* foram cultivadas na cidade de Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brasil. A extração do óleo essencial de folhas frescas foi realizada por destilação a vapor (120 min) utilizando um Aparelho Clevenger. Após sua extração, o óleo essencial foi armazenado em frascos de vidro âmbar até a sua utilização. A determinação do perfil dos óleos essenciais foi realizada por GC-MS (cromatografia gasosa/espectrometria de massa) das espécies supracitadas foi realizada segundo Parodi et al. (2014).

### Testes de sensibilidade *in vitro*

Foram testados 28 isolados de *Aeromonas* spp. provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE. Esses isolados foram obtidos a partir de rim, tegumento, intestino e lesões de exemplares de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) provenientes da Barragem de Sobradinho (Bacia do Rio São Francisco) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), provenientes do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CIRPA-CODEVASF), região Nordeste do Brasil. Os micro-organismos foram previamente identificados por meio de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme Quinn et al. (1994).

Foi pesado 0,25 g de cada óleo essencial, após prévio cálculo das densidades dos

mesmos, os quais foram diluídos em Metanol e DMSO (1:1) obtendo-se uma solução estoque de 25.000 µg/mL. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo e determinação da CBM (Concentração bactericida mínima) de acordo com as diretrizes do documento M07-A9 (CLSI, 2014) e consistiu na distribuição de 200 µL de caldo Müller-Hinton (MH) em placas estéreis de microtitulação de 96 poços. A seguir, 200 µL da solução estoque dos óleos essenciais foram acrescidos ao primeiro poço e, após homogeneização, foram transferidos para o segundo poço e assim sucessivamente, sendo obtidas as seguintes concentrações finais: 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,3; 390,6; 195,3 e 97,6 µg/mL para OEAT e OELA.

Para a preparação do inóculo foi utilizado cultivo bacteriano em caldo MH, obtendo-se uma suspensão bacteriana com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, previamente estabelecida através da leitura em espectrofotômetro na absorvância de 580 nm, obtendo uma densidade óptica de 0,16 para os isolados de *Aeromonas* spp. ou  $7,64 \times 10^8$  Unidades Formadora de Colônia (UFC)/mL. Desta suspensão, foi inoculado 20 µL nos poços das microplacas contendo as diluições de ambos os óleos essenciais. Após estes procedimentos, as microplacas foram incubadas por 24 h a 28 °C em condições de aerobiose. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, com auxílio de um replicador. Alíquotas foram retiradas das microplacas e semeadas na superfície de placas de Petri contendo ágar MH, sendo incubadas a 28 °C por 24 h. A CBM foi definida como a menor concentração dos óleos essenciais capaz de causar a morte do inóculo. Além do controle positivo (bactéria e caldo MH) e negativo (caldo MH), foi realizada a atividade antimicrobiana do diluente.

### **Análise da capacidade de formação do biofilme**

Para a caracterização da produção fenotípica do biofilme foi utilizada a técnica da violeta de genciana (MERINO et al., 2009). Utilizaram-se 21 isolados de *Aeromonas* spp. inoculados em 3 mL de TSB (Tryptone Soya Broth) e incubados a 27 °C por 24 h. Após o período de incubação, foram retirados 5 µL e aplicados em microplacas novas e estéreis contendo 195 µL de TSB e novamente incubadas a 27 °C por 24 h. Após, todos os poços da microplaca foram lavados em 200 µL de água destilada por três vezes e, em seguida coradas com 200 µL de uma solução de violeta de genciana a 0,25% e expostas de 2 a 3

minutos a temperatura ambiente. As microplacas foram novamente lavadas por três vezes com água destilada e, ao final, foram adicionados 200 µL de álcool-acetona (80:20). A densidade óptica (DO) foi medida em leitor de microplacas ASYS EXPERT PLUS BioChrom (ELISA) e a absorbância mensurada em filtro de 620 nm. A intensidade da produção de biofilme foi medida pela quantidade de violeta de genciana remanescente nos poços, sendo esta maior que a observada para o controle negativo (meio de cultura). Os testes foram realizados em triplicata. De acordo com os valores de DO obtidos, os isolados foram classificados como disposto na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos isolados de *Aeromonas* spp. quanto a produção de biofilme.  $DO_A$  = Densidade óptica da amostra teste;  $DO_{CN}$  = Densidade óptica do controle negativo (MERINO et al., 2009).

<b>Classificação</b>	<b>Critério</b>
Negativo	$DO_A \leq DO_{CN}$
Fraco produtor	$DO_{CN} < DO_A \leq (2 \times DO_{CN})$
Moderado produtor	$(2 \times DO_{CN}) < DO_A \leq (4 \times DO_{CN})$
Forte produtor	$(4 \times DO_{CN}) \leq DO_A$

#### **Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* e *Lippia alba* em isolados de *Aeromonas* spp.**

O protocolo de interferência com a formação do biofilme baseou-se na metodologia de Nostro et al. (2007) com modificações. Os inóculos bacterianos foram cultivados em tubos contendo 3 mL de TSB 0,25% por 24 h a 28 °C. Em seguida, 100 µL deste cultivo foram acrescidos em microplaca de 96 poços juntamente com 100 µL da solução contendo o equivalente à metade do valor da CBM observado na microdiluição em placa. Após 24 h de incubação a 28 °C, as microplacas foram lavadas com 200 µL de água destilada três vezes. Em seguida, os poços foram corados com 100 µL de violeta de genciana 0,25% por 5 minutos. Todos os poços foram novamente lavados três vezes com 200 µL de água destilada, e em seguida, utilizou-se 200 µL de álcool-acetona (80:20) com análise da absorbância em leitor de microplaca mensurada em 620 nm.

### **Interferência dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* e *Lippia alba* com o biofilme consolidado em isolados de *Aeromonas* spp.**

No biofilme consolidado 100 µL do inóculo bacteriano foi incubado em microplacas por 24 h a 27 °C, ocorreu a lavagem com 200 µL de água destilada estéril três vezes, a fim de retirar a população de células não aderidas e foi realizada a primeira leitura (0h) em leitor de microplacas modelo ASYS EXPERT PLUS BioChrom (ELISA) e a absorbância mensurada em filtro de 620 nm. Em seguida 200 µL da solução contendo os óleos essenciais, equivalente à metade do valor de CBM observado na microdiluição em placa, foram acrescentadas e posteriormente incubadas por 24 h, sendo então realizada a leitura após 24 h. Após o registro das DO calculou-se a média das triplicatas e então dividiu-se a DO 0 h pela DO 24 h e o resultado foi multiplicado por 100 para verificação da porcentagem de interferência com o biofilme consolidado. Como controle negativo foi utilizada o meio TSB estéril, sendo também utilizado como controle do processo a fim de se avaliar uma provável contaminação. A DO foi medida em leitor de microplaca (620nm). Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **Efeito sinérgico dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* e *Lippia alba* com florfenicol**

A suspensão bacteriana foi padronizada a partir de uma cultura com 24 h de incubação em meio MH, com adição de PBS pH 7,0 estéril até atingir a turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Foi adicionado 100 µL de caldo MH em todos os poços. Na coluna nº 12 foi adicionado 100 µL do antibiótico florfenicol (Sigma-Aldrich) na concentração de 4X o valor da concentração inibitória mínima (CIM) para realização da diluição seriada no sentido horizontal até a coluna nº 1. Na linha “A” foi adicionado 100 µL da solução correspondente ao produto natural, na concentração de 8X o valor da CIM e diluído seriadamente na vertical até a linha F. Foi acrescentado em cada poço da placa de microdiluição 10 µL do inóculo. Nos poços H1, H2 e H3 foram adicionados 10 µL da suspensão bacteriana, juntamente com 100 µL de meio MH. Nos poços H4, H5 e H6 foram adicionados 100 µL do meio MH como controle de esterilidade do processo. As microplacas foram incubadas por 24 h a 28 °C. Após incubação, 20 µL de uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio foi acrescentada em cada poço. Então foi

calculado o Índice de Fração Inibitória (IFI) por meio da seguinte fórmula: FIC produto natural = CIM combinado/CIM isolado ou FIC antibiótico = CIM/CIM isolado. A somatória dos IFIs ( $\Sigma$ IFI = IFI produto natural + IFI antibiótico) foi utilizada para a classificação dos efeitos, da seguinte forma: Sinergismo =  $\Sigma$ IFI  $\leq$  0,5; Aditivo =  $0,5 < \Sigma$ IFI  $< 1$ ; Indiferente =  $1 < \Sigma$ IFI  $< 2$  e; Antagonismo =  $\Sigma$ IFI  $> 2$ .

## RESULTADOS

### Composição química dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* e *Lippia alba*

Foram identificados 12 constituintes em OEAT que corresponderam a 95,96% do total, sendo os compostos majoritários  $\alpha$ -citral (39,91%), E-carveol (25,36%) e limonene (21,52%) (Tabela 2). Para OELA, 11 constituintes foram identificados, representando 94,68% do total, onde linalool (81,64%) foi o composto majoritário (Tabela 3).

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de *Aloysia triphylla*. IRC: Índice de retenção calculado; IRL: Índice de retenção da literatura (NIST, 2008; ADAMS, 2009).

IRC	IRL	Composto químico	Composição percentual
984	986	5-Hepten-2-one 6-methyl	0,77
1027	1026	Limonene	21,52
1046	1048	$\beta$ -Z-ocimene	0,46
1222	1228	E-Geraniol	0,35
1237	1236	E-Carveol	25,36
1266	1270	$\alpha$ -Citral	39,91
1418	1415	$\beta$ -Caryophyllene	2,55
1479	1483	$\alpha$ -Curcumene	1,16
1493	1487	Alloaromadendrene	0,53
1575	1578	Spathulenol	0,59
1580	1583	Caryophyllene Oxide	2,45
1640	1639	$\tau$ -Cadinol	0,30
<b>Total identificado</b>			<b>95,96</b>

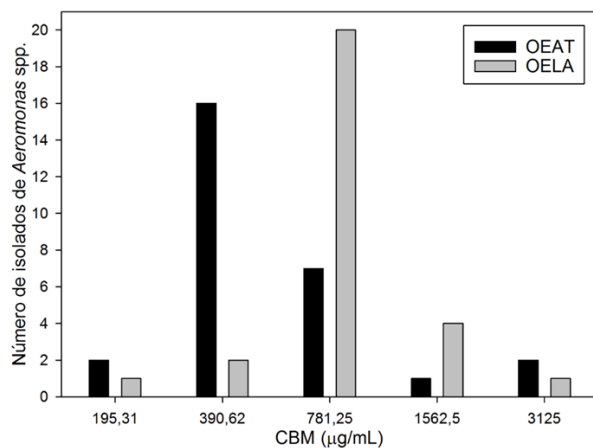
Tabela 3. Composição química do óleo essencial de *Lippia alba*. IRC: Índice de retenção calculado; IRL: Índice de retenção da literatura (NIST, 2008; ADAMS, 2009).

IRC	IRL	Composto químico	Composição percentual
970	973	Sabinene	0,45
982	985	$\beta$ -Pinene	07,7
1027	1028	Limonene	0,28
1030	1031	Eucalyptol	3,82
1046	1050	$\beta$ -E-ocimene	0,33
1099	1100	Linalool	81,64
1207	1200	Carveol	1,39
1266	1269	$\alpha$ -Citral	2,30
1388	1391	$\beta$ -Elemene	0,21
1418	1415	$\beta$ -Caryophyllene	1,60
1480	1481	$\beta$ -Cubebene	1,87
<b>Compostos identificados</b>			<b>94,68</b>

### Atividade antimicrobiana

O efeito antimicrobiano do OEAT e OELA sobre os isolados de *Aeromonas* spp. apresentaram CBM variando de 197,3 a 3125,0  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 1).

Figura 1. Sensibilidade de *Aeromonas* spp. frente aos óleos essenciais de *A. triphylla* (OEAT) e *L. alba* (OELA). CBM = Concentração Bactericida mínima.



Quanto à produção de biofilme, 2 isolados (9,52%) não formaram biofilmes e 19



isolados apresentaram capacidade de produzir biofilmes, em que 76,19% das estirpes mostraram fraca formação e 14,29% apresentaram moderada formação (Tabela 4).

Dos isolados que apresentaram moderada capacidade para formar biofilme ( $n = 3$ ) (Tabela 5) foram submetidos à ação dos dois óleos essenciais para avaliar a influência dos mesmos na etapa inicial de formação do biofilme, bem como no biofilme já consolidado (Tabela 6). Ambos os óleos essenciais foram capazes de diminuir a formação de biofilme nos 2 isolados que passaram do estado de moderados a fraco produtores (Tabela 5). No entanto, nenhum efeito foi observado no biofilme já consolidado (Tabela 6).

Tabela 4. Classificação dos isolados de *Aeromonas* spp. quanto a produção de biofilmes. (NOSTRO et al., 2007). DO = densidade óptica. DO do meio = 0,07.

<b>Identificação dos isolados de <i>Aeromonas</i> spp.</b>	<b>DO média</b>	<b>Classificação quanto à produção de biofilmes</b>
G1	0,069	Não produtor
G6	0,107	Fraco
G21	0,082	Fraco
G31	0,095	Fraco
G32	0,080	Fraco
G33	0,119	Fraco
G34	0,099	Fraco
G36	0,114	Fraco
G38	0,123	Fraco
A10	0,100	Fraco
A14	0,078	Fraco
10	0,090	Fraco
11	0,117	Fraco
35	0,112	Fraco
54	0,103	Fraco
IF1	0,108	Fraco
IF2	0,065	Não produtor
IF3	0,109	Fraco
10M	0,162	Moderado
60	0,218	Moderado
74	0,154	Moderado

Tabela 5: Classificação dos isolados de *Aeromonas* spp. quanto a produção de biofilmes na presença dos óleos essenciais de *A. triphylla* e *L. alba*. (NOSTRO et al., 2007). DO = densidade óptica. DO do meio = 0,07

Identificação do isolado	Óleo essencial de <i>A. triphylla</i>	
	DO média	Classificação
60	0,127	Fraco produtor
74	0,111	Fraco produtor

Identificação do isolado	Óleo essencial de <i>L. alba</i>	
	DO média	Classificação
60	0,133	Fraco produtor
74	0,121	Fraco produtor

Tabela 6: Atividade dos óleos essenciais de *A. triphylla* e *L. alba* sobre o biofilme consolidado de *Aeromonas* spp. (NOSTRO et al., 2007). DO = Densidade óptica. DO do meio = 0,07.

Identificação do isolado	Óleo essencial de <i>A. triphylla</i>		
	DO (0h) média	DO (24h) média	DO 24h - DO 0h (%)
60	0,052	0,063	82,98
74	0,044	0,050	88,00

Identificação do isolado	Óleo essencial de <i>L. alba</i>		
	DO (0h) média	DO (24h) média	DO 24h - DO 0h (%)
60	0,049	0,058	85,05
74	0,046	0,053	86,25

O OEAT e OELA quando combinados com o antibiótico florfenicol, reduziram as suas concentrações antimicrobianas do que quando avaliados sozinho (Tabela 7 e 8).

Tabela 7: Índice de concentração inibitória fracionária (IFI) utilizado para determinar o tipo de interação entre o óleo essencial de *Aloysia triphylla* (OEAT) e o florfenicol em isolado (10M) de *Aeromonas* spp. IFI = Índice de fração combinatória. FLOR= Florfenicol.

Substância teste	CIM/CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )		IFI	$\Sigma$ IFI	Resultado
	Sozinho	Combinado			
OEAT	390,6	97,6	0,25	0,28	Sinérgico
FLOR	1,95	0,06	0,03		
	390,6	97,6	0,25	0,31	Sinérgico
	1,95	0,12	0,06		
	390,6	97,6	0,25	0,37	Sinérgico
	1,95	0,24	0,12		
	390,6	97,6	0,25	0,49	Sinérgico
	1,95	0,48	0,24		
	390,6	48,8	0,12	0,15	Sinérgico
	1,95	0,06	0,03		
	390,6	48,8	0,12	0,18	Sinérgico
	1,95	0,12	0,06		
	390,6	48,8	0,12	0,24	Sinérgico
	1,95	0,24	0,12		
	390,6	48,8	0,12	0,37	Sinérgico
	1,95	0,48	0,25		
	390,6	24,4	0,06	0,18	Sinérgico
	1,95	0,24	0,12		
	390,6	24,4	0,06	0,30	Sinérgico
	1,95	0,48	0,24		
	390,6	12,2	0,03	0,27	Sinérgico
	1,95	0,48	0,24		

Tabela 8: Índice de concentração inibitória fracionária (IFI) utilizado para determinar o tipo de interação entre o óleo essencial de *Lippia alba* e o florfenicol em isolado (10M) de *Aeromonas* spp.

Substância	CIM/CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )			$\Sigma$ IFI	Resultado
	Sozinho	Combinado	IFI		
OELA	390,6	97,6	0,25	0,28	Sinérgico
FLOR	1,95	0,06	0,03		
	390,6	97,6	0,25	0,31	Sinérgico
	1,95	0,12	0,06		
	390,6	97,6	0,25	0,37	Sinérgico
	1,95	0,24	0,12		
	390,6	97,6	0,25	0,49	Sinérgico
	1,95	0,48	0,24		
	390,6	48,8	0,12	0,15	Sinérgico
	1,95	0,06	0,03		
	390,6	48,8	0,12	0,18	Sinérgico
	1,95	0,12	0,06		
	390,6	48,8	0,12	0,24	Sinérgico
	1,95	0,24	0,12		
	390,6	48,8	0,12	0,37	Sinérgico
	1,95	0,48	0,25		
	390,6	24,4	0,06	0,09	Sinérgico
	1,95	0,06	0,03		
	390,6	24,4	0,06	0,18	Sinérgico
	1,95	0,24	0,12		
	390,6	24,4	0,06	0,30	Sinérgico
	1,95	0,48	0,24		
	390,6	12,2	0,03	0,15	Sinérgico
	1,95	0,24	0,12		
	390,6	12,2	0,03	0,27	Sinérgico
	1,95	0,48	0,24		

## DISCUSSÃO

O uso de substâncias antimicrobianas naturais (óleos essenciais), bem como a exploração do efeito sinérgico pela combinação com antibióticos, visando reduzir as concentrações destes, é uma alternativa e pode contribuir com a diminuição da resistência bacteriana que é um grande problema de saúde global (BORGES et al., 2016; BARRETO et al., 2014).

Os óleos essenciais são uma fonte de componentes químicos como terpenóides, monoterpênicos com capacidade antimicrobiana, como observado em estudos prévios em OEAT (CRESTANI et al., 2012; PARODI et al., 2013) e OELA (MACHADO et al., 2014; OLIVERO-VERBEL et al., 2014; SUTILI et al., 2015). Além disso, alguns componentes de óleos essenciais ricos em compostos fenólicos exibem altíssima atividade antioxidante, semelhantes a do BHT e o  $\alpha$ -tocoferol (BAŞER e BUCHBAUER, 2010).

Os componentes majoritários dos óleos essenciais encontrados neste estudo foram diferentes do encontrado em estudos prévios. Majolo et al. (2016) encontraram como componentes majoritários geranial, neral e  $\beta$ -Caryophyllene no óleo essencial de três espécies de *Lippia* sp. Crestani et al. (2012), identificaram o limoneno, neral, geranial e óxido de cariofileno como maiores constituintes em OEAT. Já Teixeira et al. (2016) obtiveram geranial e neral como os maiores constituintes químicos do OEAT. Entretanto, foi semelhante ao obtido por Saccol et al. (2013) e Hohlenwerger et al. (2016) que avaliaram os constituintes do OELA cultivados na mesma região do presente trabalho e também descreveram linalool como constituinte majoritário de OELA (55,26 e 47,66%, respectivamente).

Possíveis diferenças na composição química dos óleos essenciais decorrem de variações quali-quantitativas em função de fatores genéticos, origem geográfica, macro e micronutrientes no solo, local de extração dos óleos, método de extração, horário de colheita, dentre outros (NABRDALIK e GRATA, 2016).

Sartoratto et al. (2004) propuseram que valores de CIM entre 50-500, 600-1500 e acima de 1600  $\mu\text{g/mL}$  são considerados de forte, moderada e fraca atividade, respectivamente. Dos isolados testados, apenas dois apresentaram sensibilidade de 3125  $\mu\text{g/mL}$ . Portanto os óleos essenciais apresentaram atividade de forte a moderada para a

maioria dos isolados. Outro fator importante a observar é que as atividades antimicrobianas são baseadas na CIM e neste estudo os valores são baseados na CBM. De forma geral, a CIM é menor que a CBM, em face disso, esses isolados poderiam apresentar valores ainda menores. Alguns estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana como o de Majolo et al. (2016) encontraram CIM e CBM que variaram de 1250 a 5000 µg/mL com óleo essencial de três espécies de *Lippia* sp. em *A. hydrophila*. Sutili et al. (2015) avaliaram a atividade de OELA e observaram CBM de 5998 µg/mL. Oliva et al. (2015) testaram três concentrações celulares de *Staphylococcus aureus* e obtiveram CBM de 5900 µg/mL com uso de OEAT. Diferenças nos compostos identificados podem explicar as diferenças de efeito antimicrobiano em relação a estudos prévios.

Outros fatores que podem contribuir para resultados divergentes incluem a técnica de ensaio, micro-organismos testados, condições de cultura, interações entre os constituintes dos óleos essenciais, volatilidade e insolubilidade (FALEIRO, 2011; RATTANACHAIKUNSOPON e PHUMKHACHORN, 2010).

Estudos prévios afirmam que o modo de ação dos óleos essenciais deve-se aos seus componentes majoritários (BENOVIT et al., 2015; CRESTANI et al., 2012) ou das interações entre eles (DORMAN et al., 2000). Embora acredita-se que envolva uma ação sinérgica dos vários componentes (KHAN et al. 2009), uma vez que a maioria deles se apresenta em menores porcentagens.

Um dos mecanismos dos óleos essenciais é a desordem na membrana externa com perda da integridade da membrana citoplasmática, interações com proteínas de membrana ATPases, deixando-as mais permeáveis com liberação de moléculas ou íons essenciais, inibição da síntese enzimática ou absorção de nutrientes, causando a morte bacteriana (CRISTANI et al., 2007; BAKKALI et al., 2008; RATTANACHAIKUNSOPON e PHUMKHACHORN, 2010; NAZZARO et al., 2013).

Alterações morfológicas na parede celular e na membrana externa de *A. hydrophila* foram observadas por técnicas de microscopia eletrônica quando expostos aos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* (AZERÊDO et al., 2012).

As bactérias Gram-positivas, parecem ser mais influenciadas pela ação dos óleos essenciais do que as Gram-negativas, como *Aeromonas* sp. Isto se deve à estrutura morfológica da parede celular bacteriana das bactérias Gram-negativas, que é mais

complexa com membrana externa composta por lipopolissacarídeos (TROMBETTA et al., 2005), contudo, o caráter lipofílico dos óleos essenciais pode interagir com os lipopolissacarídeos, particionar a membrana externa de bactérias Gram-negativas e causar alterações na sua estrutura e função, levando a lise bacteriana (ZENGIN e BAYSAL, 2014).

Os constituintes ativos predominantes nos óleos essenciais foram os monoterpenos e o efeito antimicrobiano contra *Aeromonas* spp. pode estar associado a ação destes. Oliveira et al. (2006) atribuíram a atividade antimicrobiana de duas espécies de *Lippia* sp. ao alto conteúdo de monoterpenos contendo oxigênio. Fato este observado também para o extrato de *A. triphylla* contra *Aeromonas* spp. (PARODI et al., 2013). Modificação da conformação da membrana também foi observada por Ben Arfa et al. (2006) em que o grupo OH- livre dos monoterpenos produz pontes de hidrogênio com liberação de prótons, resultando na lise celular.

Um dos mecanismos de resistência às drogas antimicrobianas pelas bactérias pode ser a presença de biofilme. Estes apresentam capacidade de resistência cerca de 10 a 1000 vezes maior aos antimicrobianos e ao sistema imune do hospedeiro (CLUTTERBUCK et al., 2007), o que confere maior tolerância e resistência aos antibióticos, dificultando o tratamento de infecções (WU et al., 2014). Kerekes et al. (2013) informam que os óleos essenciais inibem a formação de biofilme e, segundo Burt (2004), danos à parede bacteriana podem influenciar a capacidade de fixação e comprometer a etapa inicial de formação do biofilme. Chmit et al. (2014) observaram atividade antibiofilme ao utilizarem óleo essencial de *Laurus nobilis* em *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Também foi observada redução significativa na produção de biofilmes em *A. hydrophila* com óleo essencial de *Tymus vulgaris* (MILLEZI et al., 2013).

O uso de fitoquímicos para tratar patógenos formadores de biofilme são uma das novas perspectivas para o desenvolvimento de novos produtos com ação voltada para prevenir ou extinguir a comunidade microbiana formadora do biofilme (RIBEIRO et al., 2016), preferencialmente nos biofilmes em formação, uma vez que a resistência em biofilmes consolidados já é documentada e de difícil controle (CHANDRA et al., 2001). Inibir a formação de biofilmes parece ser uma estratégia mais eficiente em vez de interferir em biofilmes já estabelecidos, como observado no presente estudo.

A atividade antimicrobiana de fitoquímicos consistindo de compostos principais e/ou os seus componentes combinados com antibióticos convencionais possuem possíveis efeitos sinérgicos e pode ser utilizado tanto para melhorar a sua atividade antimicrobiana, quanto para reduzir suas concentrações, potencializando o efeito antimicrobiano e permitindo que antibióticos já ineficazes sejam novamente eficientes (NASCIMENTO et al., 2000; NAZZARO et al., 2013).

A terapia combinada entre óleos essenciais ou seus constituintes tem sido fundamental para o tratamento de infecções graves e para redução da resistência de microorganismos a múltiplas drogas (KAMATOU et al., 2012). A utilização de linalool ou mentol, combinados com eugenol, apresentou maior sinergia, associados aos efeitos de um fenol com um álcool monoterpenoide (BASSOLÉ et al., 2010).

Adicionalmente, a associação entre óleos essenciais e antibióticos sintéticos pode contribuir para diminuição da resistência bacteriana, uma vez que somente o uso de antibiótico sintético pode não produzir o efeito inibitório desejável (MAHMOUD et al., 2016). Neste estudo, observou-se que a combinação do OEAT e OELA ao florfenicol reduziu as concentrações antimicrobianas, demonstrando o grande potencial sinérgico de tais compostos, o que pode potencialmente ser utilizado como nova alternativa terapêutica e contribuir para a diminuição da resistência bacteriana a múltiplas drogas.

O efeito sinérgico entre óleos essenciais e antibióticos sintéticos foi verificada por Moussaoui e Alaoui (2016) ao avaliaram o potencial sinérgico de cinco óleos essenciais (*Origanum compactum*, *Chrysanthemum coronarium*, *Thymus willdenowii* Boiss, *Melissa officinalis* e *Origanum majorana* L.) combinados com os antibióticos gentamicina (10 mg), tobramicina (30 mg), imipenem (10 mg) e ticarcilina (75 mg). Os mesmos autores destacaram o benefício do uso combinado de óleos essenciais com antibióticos sintéticos contra a resistência microbiana a medicamentos.

A importância dos constituintes bioativos das plantas na fitomedicina reside na eficiência da utilização de baixas doses por meio das interações sinérgicas (BORGES et al., 2016). Barreto et al. (2014) encontraram redução de até dez vezes nos antibióticos neomicina e amicacina quando combinadas com *Lippia origanoides* contra *S. aureus* metilina resistente. Tais estudos demonstram o grande potencial de óleos essenciais para reduzir a dose de uso de antibióticos sintéticos, assim como verificado neste estudo, com a *L. alba* e *A. triphylla* que possuem potencial o que possibilita a obtenção de óleo



essencial em larga escala.

## CONCLUSÃO

O OEAT apresentou como componentes majoritários  $\alpha$ -citril, E-carveol e o limonene; e OELA o linalool. OEAT e OELA demonstraram potencial atividade antimicrobiana frente a isolados de *Aeromonas* spp. Foram capazes de interferir com a formação de biofilmes. Além disso, apresentaram efeito sinérgico com florfenicol reduzindo a dose utilizada, o que tende a contribuir com a diminuição da resistência bacteriana.

## AGRADECIMENTOS

À CODEVASF Petrolina-PE, pela doação dos peixes, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto e a Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa concedida a RCS.

## REFERÊNCIAS

ACAR, U.; KESBIÇ, O.S.; YILMAZ, S.; GÜLTEPE, N.; TÜRKER, A. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, v. 437, p. 282-286, 2015.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4 ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2009.

AHIRRAO, S.D.; SURYAWANSHI, S.P. Antibiotic study of *Zingiber officinale* extract against *Pseudomonas aeruginosa* and standardization with some commercial antibiotics Co-trimoxazole and Imperem. **International Journal of Scientific Research**, v. 5, p.121-122, 2016.

AZERÊDO, A.G.; STAMFORD, T.L.M.; QUEIROZ DE FIGUEIREDO, R.C.B.; LEITE DE SOUZA, E. The cytotoxic effect of essential oils from *Origanum vulgare* L. and/or *Rosmarinus officinalis* L. on *Aeromonas hydrophila*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, p. 298-304, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A Review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARRETO, H.M.; DE LIMA, I.S.; COELHO, K.M.R.N.; OSÓRIO, L.R.; DE ALMEIDA MOURÃO, R.; SANTOS, B.H.C.D.; COUTINHO, H.D.M.; DE ABREU, A.P.L.; DE MEDEIROS, M.D.G.F.; CITÓ, A.M.D.G.L.; LOPES, J.A.D. Effect of *Lippia organoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 6, p. 560-564, 2014.

BAŞER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: Science, technology and applications**. Taylor and Francis; New York: 2010. 994p.

BASSOLÉ, I. H. N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; TIROGO, S.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R. C.; DICKO, M. H. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x Piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. **Molecules**, v. 15, p. 7825-7839, 2010.

BEN ARFA, A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 149-154, 2006.

BENOVIT, S.C.; SILVA, L.L.; SALBEGO, J.; LORO, V.L.; MALLMANN, C.A.; BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E.M.M.; HEINZMANN, B.M. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.)

Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 1675-1689, 2015.

BORGES, A.; ABREU, A.; DIAS, C.; SAAVEDRA, M.; BORGES, F.; SIMÕES, M. New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. **Molecules**, v. 21, p. 1-41, 2016.

BUDZYŃSKA, A.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; SADOWSKA, B.; KALEMBA, D.; ROZALSKA, B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, p. 35-41, 2011.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a Review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L.L.; MCCORMICK, T.; e GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal Bacteriology**, v.183, p. 5385-5394, 2001.

CHMIT, M.; KANAAN, H.; HABIB, J.; ABBASS, M.; MCHEIK, A.; CHOKR, A. Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. 546-552, 2014.

CHONG, Y.M.; YIN, W.F.; HO, C.Y.; MUSTAFA, M.R.; HADI, A.H.A.; AWANG, K.; NARRIMA, P.; KOH, C.L.; APPLETON, D.R.; CHAN, K.G. Malabaricone C from *Myristica cinnamomea* exhibits antiquorum sensing activity. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2261-2264, 2011.

CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. **Agriculture**, v. 2, p. 228–243, 2012.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M07-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2014. Disponível em: <<http://www.clsi.org/>>. Acesso em 15.10.2015.

CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p. 1-17, 2007.

CRESTANI, L.; MANICA, V.; CHIARADIA, V.; PUTON, B.M.S.; PAROUL, N.; CANSIAN, R.L. Caracterização química e atividade antibacteriana do óleo essencial de erva-luísia (*Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton), **Perspectiva**, v. 36, p.5 3-63, 2012.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6300-6308, 2007.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

FALEIRO, M. L. The mode of antibacterial action of essential oils. **Microbiology Book Series**, v. 2, p. 1143-1156, 2011. Disponível em: [/www.formatex.info/microbiology3/book/1143-1156.pdf](http://www.formatex.info/microbiology3/book/1143-1156.pdf). Acessado em: 10.02.2017.

GIRI, S.S.; SEN, S.S.; CHI, C.; KIM, H.J.; YUN, S.; PARK, S.C.; SUKUMARAN, V. Effect of guava leaves on the growth performance and cytokine gene expression of *Labeo rohita* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 46, p. 217-224, 2015.

HAFEDH, H.; FETHI, B.A.; MEJDI, S.; EMIRA, N.; AMINA, B. Effect of *Mentha longifolia* L. essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p.1122-1127, 2010.

HOHLENWERGER, J.C.; EDUARDO COPATTI, C.; CEDRAZ SENA, A.; DAVID COUTO, R.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D. Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 49, p. 119-126, 2016.

HOHLENWERGER, J.C.; BALDISSEROTTO, B.; COUTO, R.D.; HEINZMANN, B.M.; SILVA, D.T.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, 2017.

KAMATOU, G.P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A.M. Eugenol-From the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v. 17, p. 6981-6953, 2012.

KARÁSKOVÁ, K.; SUCHÝ, P.; STRAKOVÁ, E. Current use of phytogetic feed additives in animal nutrition: a review. **Czech Journal of Animal Science**, v. 60, p. 521-530, 2016.

KEREKES, E.-B.; DEÁK, É.; TAKÓ, M.; TSERENNADMID, R.; PETKOVITS, T.; VÁGVÖLGYI, C.; KRISCH, J. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 933-942, 2013.

KHAN, M. S. A.; ZAHIN M.; HASAN S.; HUSAIN F. M.; AHMAD, I. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. **Letters Applied Microbiology**, v.49, p. 354-360, 2009.

- KIM, Y.-G.; LEE, J.-H.; GWON, G.; KIM, S.-I.; PARK, J. G.; LEE, J. Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. **Scientific Reports**, v. 6, p. 363- 377, 2016.
- MACHADO, T.F.; PEREIRA, R.C.A.; BATISTA, V.C.V. Seasonal variability of the antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia alba*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 515-519, 2014.
- MADHURI, S.; SAHNI, Y.P.; PANDEY, G. Herbal feed supplement as drugs and growth promoter to fishes. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, p. 30-33, 2012.
- MAHMOUD, A.M.; EL-BAKY, R.M.A.; AHMED, A.B.F.; GAD, G.F.M. Antibacterial activity of essential oils and in combination with some standard antimicrobials against different pathogens isolated from some clinical specimens. **American Journal of Microbiological Research**, v. 4, p. 16-25, 2016.
- MAJOLO, C.; DA ROCHA, S.I.B.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; BIZZO, H.R. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/are.13073>>. Acesso em: 24 jan. 2017.
- MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J.; SOLANO, C.; CALVO, E.; LOPEZ, J.A.; FOSTER, T.J.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. Protein A-Mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.191, n.3, p.832-843, 2009.
- MILLEZI, A.F.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Reduction of *Aeromonas hidrophyla* biofilm on stainless stell surface by essential oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 73-80, 2013.
- MOUSSAOUI, F.; ALAOUI, T. Evaluation of antibacterial activity and synergistic

effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, p. 32-37, 2016.

NABRDALIK, M.; GRATA, K. Antibacterial activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil against Gram-negative bacteria, **Postępy Fitoterapii**, v.17, p. 80-86, 2016.

NASCIMENTO, G.G.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian journal of microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451-1474, 2013.

NIST/EPA/NIH. Mass spectral library and search/analysis programs. Hoboken: J. Wiley and Sons; 2008.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A.S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A.; PIZZIMENTI, F.C.; BLANCO, A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519-523, v. 56, 2007.

OLIVA, M.; CAREZZANO, E.; GALLUCCI, N.; FREYTES, S.; ZYGALDO, J.; DEMO, M. Inhibición del crecimiento y alteraciones morfológicas de *Staphylococcus aureus* causadas por el aceite esencial de *Aloysia triphylla*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, p. 83-91, 2015.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103-108, 2006.

- OLIVERO-VERBEL, J.; BARRETO-MAYA, A.; BERTEL-SEVILLA, A.; STASHENKO, E.E. Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 759-767, 2014.
- PARODI, T.V.; VARGAS, A.P.C.; KREWER, C.; FLORES, E.M.M.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; OLIVEIRA, J.V.; POPIOLSKI, A.S.; MINOZZO, M. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO<sub>2</sub> extraction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 283-292, 2013.
- PARODI, T.V.; CUNHA, M.A.; BECKER, A.G.; ZEPPENFELD, C.C.; MARTINS, D.I.; KOAKOSKI G.; BARCELLOS L.G.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO B. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 323-334, 2014.
- PATRA, J. K.; DAS, G.; BAEK, K.-H. Antibacterial Mechanism of the Action of *Enteromorpha Linza* L. Essential Oil against *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*. **Botanical Studies**, v. 56, p. 1-9, 2015.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Aeromonas*, *Plesiomonas* and *Vibrio* species, **Microbiology Veterinary Clinical**, Sec. 2, Cap. 20, p. 243-247, 1994.
- RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus Iniae* infection in tilapia (*Oreochromis Niloticus*). **Fisheries Science**, v. 76, p. 287-293, 2010.
- RIBEIRO, D.S.; DA SILVA VELOZO, E.; GUIMARÃES, A.G. Interação entre o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e drogas antimicrobianas no controle de bactérias isoladas de alimentos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, p.



10-19, 2013.

RIBEIRO, S.M.; FELÍCIO, M.R.; BOAS, E.V.; GONÇALVES, S.; COSTA, F.F.; SAMY, R.P.; SANTOS, N.C.; FRANCO, O.L. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 160, p. 133-144, 2016.

SACCOL, E.M.H.; UCZAY, J.; PÊS, T.S.; FINAMOR, I.A.; OURIQUE, G.M.; RIFFEL, A.P.K.; SCHMIDT, D.; CARON, B.O.; HEINZMANN, B.M.; LLESUY, S.F.; LAZZARI, R.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M.A. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416-417, p. 244-254, 2013.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 431-437, 2001.

SENA, A.C.; TEIXEIRA, R.R.; FERREIRA, E.L.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D.; COUTO, R.D.; COPATTI, C.E. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 465, p. 374-379, 2016.

STARLIPER, C.E.; KETOLA, H.G.; NOYES, A.D.; SCHILL, W.B.; HENSON, F.G.; CHALUPNICKI, M.A.; DITTMAN, D.E. An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 89-97, 2015.

STOLKER, A.A.M.; BRINKMAN, U.A.TH. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. **Journal of Chromatography A.**, v. 1067, p. 15-53, 2005.

SUTILI, F.J.; SLIMA SILVA, L.; GRESSLER, L.T.; BATTISTI, E.K.; HEINZMANN, B.M. VARGAS, A.C.; BALDISSEROTO, B. Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: in vitro activity and their use in experimentally infected fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p. 47-54, 2015.

TEIXEIRA, R.R.; DE SOUZA, R.C.; SENA, A.C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; COUTO, R.D.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: Anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research**, 2016. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/are.13165>>. Acessado: 09.12.16, doi: 10.1111/are.13165.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2474-2478, 2005.

WIGRAIBOON, S.; NOMURA, N.P.; WHANGCHAI, N. Effect of essential oils from *Houttuynia cordata* Thunb supplemented diets on growth performance and immune response of hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus* Linn x *Oreochromis niloticus* Linn.). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 4, p. 677-684, 2016.

WU, H.; MOSER, C.; WANG, H.-Z.; HØIBY, N.; SONG, Z.-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v. 7, p. 1-7, 2014.

ZENGIN, H.; BAYSAL, A. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity

relationships evaluated by SEM Microscopy. **Molecules**, v. 19, p. 17773-17798, 2014.

ZHENG, Z.L.; TAN, J.Y.W.; LIU, H.Y. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, p. 105-115, 2009.

ZEPPENFELD, C.C.; HERNÁNDEZ, D.R.; SANTINÓN, J.J.; HEINZMANN, B.M.; DA CUNHA, M.A.; SCHMIDT, D.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of Silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 933-940, 2015.

## CAPÍTULO 2

---

**Óleo essencial de *Aloysia triphylla* na dieta de juvenis de tilápia do Nilo**

## Óleo essencial de *Aloysia triphylla* na dieta de juvenis de tilápia do Nilo

### RESUMO

Os óleos essenciais contêm compostos bioativos com propriedades que aumentam a função imune e promovem o crescimento e saúde dos peixes. Os peixes (n=200) foram aleatoriamente distribuídos em 5 tratamentos (quatro repetições) em 20 caixas (100 L). Um total de cinco tratamentos (0-controle; 0,25; 0,50; 1,0 e; 2 mL/kg de óleo essencial de *Aloysia triphylla* - OEAT) foram adicionados à dieta de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com o objetivo de investigar desempenho, hematologia, parâmetros bioquímicos e enzimas intestinais. Adicionalmente foram desafiadas com *Aeromonas* spp. Com o aumento da inclusão de OEAT na dieta de juvenis de tilápia do Nilo ocorreu melhora dos parâmetros de desempenho. As maiores concentrações de OEAT na dieta refletiram em aumento da atividade da lipase e protease intestinais, atividade de lisozima plasmática, glicose, albumina, ALT, proteínas totais plasmáticas, eritrócitos, hematócrito e redução da atividade de amilase intestinal, triglicerídeos plasmáticos, hemoglobina e índices hematimétricos. A adição do OEAT na dieta não afetou a sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo desafiados com *Aeromonas* spp. Conclui-se que a suplementação de 2,0 mL/kg de OEAT na dieta melhora o desempenho, aumenta a produção de enzimas intestinais lipase e protease alcalina e a atividade da lisozima plasmática, podendo ser utilizado como promotor de crescimento e imunoestimulante para juvenis de tilápia do Nilo.

**Palavras-chave:** desempenho, enzimas intestinais, imunoestimulante, lisozima, *Oreochromis niloticus*.

*Aloysia triphylla* essential oil in the diet of juveniles of Nile tilapia

**ABSTRACT**

Essential oils contain bioactive compounds with properties that increase immune function and promote fish growth and health. Fish (n = 200) were randomly distributed in 5 treatments (four replications) into 20 boxes (100 L). Five treatments (0-control, 0.25, 0.50, 1.0 and 2 mL / kg *Aloysia triphylla* essential oil - EOAT) were added to the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to investigate performance, hematology, biochemical parameters and intestinal enzymes. Additionally they were challenged with *Aeromonas* spp. The increase of the inclusion of EOAT in the juvenile diet of Nile tilapia, an improvement of the performance parameters was observed. The higher concentrations of EOAT in the diet reflected increased activity of intestinal lipase and protease, plasma lysozyme activity, glucose, albumin, ALT, total plasma proteins, erythrocytes and hematocrit, and reduced intestinal amylase activity, plasma triglycerides, hemoglobin and hematimetric indexes. The addition of EOAT in the diet did not affect the survival of Nile tilapia juveniles challenged with *Aeromonas* spp. It is concluded that the supplementation of 2.0 mL / kg OEAT in the diet improves the performance, increases the production of intestinal enzymes lipase and alkaline protease and the activity of plasma lysozyme and can be used as a growth promoter and immunostimulant for juvenile Nile tilapia.

**Key words:** performance, intestinal enzymes, immunostimulant, lysozyme, *Oreochromis niloticus*.

## INTRODUÇÃO

Na piscicultura, a intensificação da produção caracterizada por alta densidade de estocagem constitui-se em uma prática utilizada para o aumento da produtividade (BRANDÃO et al., 2004). Entretanto, o estresse provocado pelas altas densidades de estocagem pode desencadear alterações fisiológicas e afetar o status imunológico dos peixes, deixando-os susceptíveis a micro-organismos patogênicos, com destaque a doenças bacterianas (IGUCHI et al., 2003).

*Aeromonas* spp. é um patógeno oportunista comumente presente em criações intensivas, sendo considerado um dos principais fatores limitantes de relevância na aquicultura, por causar grandes mortalidades. Sua patogenicidade resulta em hemorragias na pele, ascite, exoftalmia, ulcerações, dentre outras (ALY et al., 2015). O tratamento é difícil, onde geralmente é realizada a antibioticoterapia tanto para prevenção, quanto para tratamento de bacterioses. Entretanto, o uso de antimicrobianos sintéticos tem mostrado um sucesso limitado na prevenção e/ou tratamento de doenças de organismos aquáticos (BELÉM COSTA e CYRINO, 2006; STARLIPER et al., 2015), onde o principal problema que envolve o seu uso é o desenvolvimento da resistência bacteriana.

Por isso, restrições ao uso de tais substâncias na aquicultura têm se tornado constantes, pois antibióticos sintéticos aumentam a pressão seletiva exercida sobre os micro-organismos, favorecendo a seleção de bactérias resistentes, com transferência de genes resistentes para as bactérias não expostas a antibióticos, o que pode comprometer a saúde de peixes e consumidores, além de gerar bioacumulação e poluição ambiental (COGLIANI et al., 2011; SHAKYA e LABH, 2014). Devido à alta prevalência de tais bacterioses nos cultivos intensivos, alternativas ao uso de antibióticos sintéticos para o tratamento de bacterioses são necessárias.

Neste contexto, estudos prévios já demonstraram que a suplementação nas dietas com óleos essenciais de plantas melhoram os índices zootécnicos, aumentam a resistência contra bacterioses, favorecem as taxas de sobrevivência e contribuem com o fortalecimento da função imune em peixes (SHEHATA et al., 2013; GÜLTEPE et al., 2014; STARLIPER et al., 2015; SUTILI et al., 2015; ZEPPEFELD et al., 2015). Além dos óleos essenciais presentes na água também agirem como redutores de estresse no manejo e transporte (SENA et al., 2016; HOHLENWERGER et al., 2016). Tais produtos

são biodegradáveis, possuem alta disponibilidade, e não representam perigo para os consumidores, o que demonstra a sua viabilidade (FIGUEIREDO e LEAL, 2008; HARIKRISHNAN et al., 2011).

O óleo essencial de *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton (OEAT) pode ser uma alternativa viável por conter diversos compostos bioativos como geranial e neral com propriedade anestésica (TEIXEIRA et al., 2016) e antimicrobiana (PARODI et al., 2013). Além disso, já demonstrou ser promotor de crescimento em jundiá (*Rhamdia quelen*) (ZEPPENFELD et al., 2015). Apesar disso, não são conhecidos os efeitos da inclusão de OEAT na dieta de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

A tilápia do Nilo é uma das espécies dulciaquícolas mais importante para a aquicultura mundial devido à taxa de crescimento rápido, adaptação a diversos sistemas de criação e fácil aceitabilidade de dietas com maior teor de ingredientes vegetais. Seu filé atrai consumidores por possuir carne branca e ausência de espinhos intramusculares (EL-SAYED, 2006; FAO, 2016). Embora seja uma espécie rústica, quando criadas em sistemas intensivos, estão sujeitas à infecções bacterianas que provocam perdas substanciais na produção.

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de diferentes níveis de OEAT na dieta em relação ao crescimento, parâmetros metabólicos e sanguíneos e a resistência de juvenis de tilápia do Nilo a *Aeromonas* spp.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Óleo essencial de *Aloysia triphylla*

*Aloysia triphylla* foi cultivada na cidade de Frederico Westphalen, região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O OEAT (densidade de 0,9 g/mL) foi extraído de folhas frescas por destilação a vapor e armazenado em frascos de vidro âmbar até a sua utilização. Os constituintes majoritários identificados de OEAT deste estudo foram o  $\alpha$ -Citral (39,91%) *E*-Carveol (25,36%) e Limonene (21,52%) (cap.1).



## **Animais e condições experimentais**

Um total de 200 juvenis de tilápia do Nilo ( $10,79 \pm 0,02$  g;  $8,92 \pm 0,02$  cm), invertidos sexualmente, provenientes de uma mesma desova, foram adquiridos do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CIRPA-CODEVASF) região Nordeste do Brasil, local onde foi realizado o experimento. Os peixes foram pesados, medidos e distribuídos aleatoriamente em 20 caixas d'água de polietileno com capacidade de 100 L (n=10) em um sistema de circulação aberto. Os exemplares foram aclimatados durante 14 dias à dieta e as condições experimentais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê em Experimentação Animal da UFBA/Instituto de Biologia sob número 22/2015.

As variáveis de qualidade de água foram mensuradas e mantidas em pH:  $6,88 \pm 0,01$  (Hanna - HI 98130), temperatura  $25,54 \pm 0,14$  °C e oxigênio dissolvido  $5,75 \pm 0,25$  mg/L (Politerm- POL 60), e amônia total  $0,10 \pm 0,0$  mg N-NH<sub>3</sub> /L por meio de kit (Alfatecnoquímica, Florianópolis, SC, Brasil). Foi realizada uma sifonagem diária para remoção de fezes e eventuais sobras de alimento e limpeza interna da parede dos tanques semanalmente.

## **Dietas experimentais e alimentação**

Foram formuladas cinco dietas experimentais as quais deram origem a 5 tratamentos, cada um com 4 tratamentos, isoproteicas e isoenergéticas (32% PB; 3200 Kcal de ED/kg de dieta) que se constituíram de uma dieta controle (sem OEAT) e quatro níveis de inclusão de OEAT: 0,25, 0,50, 1,0 e 2,0 mL/kg de dieta (Tabela 1). As concentrações de OELA na dieta foram definidos de acordo com Zeppenfeld et al. (2015).

As rações foram elaboradas pela mistura dos ingredientes finamente moídos até homogeneidade e adicionado óleo de soja juntamente com OEAT, umedecidos com água aquecida com posterior peletização em máquina experimental tipo moer carne e imediatamente levadas à estufa de ventilação forçada a 35 °C por 24 h. Após a secagem, as mesmas foram trituradas em granulometria adequada aos peixes e mantidas em refrigeração (- 20 °C) até sua utilização.

Tabela 1: Formulação e composição percentual da dieta basal.

Ingredientes	%
Farelo de soja (45%)	52,00
Fubá de milho	25,40
Farinha de peixe (55%)	9,73
Farinha de trigo	10,00
Fosfato bicálcico	0,50
Óleo de Soja	0,83
Premix <sup>1</sup>	0,50
Sal	0,50
Vitamina C <sup>2</sup>	0,20
Butil Hidroxi- Tolueno	0,02
Propionato de Cálcio	0,10
Inerte <sup>3</sup>	0,22

<sup>1</sup> Ácido Fólico: 1.200 mg/kg; Ácido Nicotínico: 20 g/kg; Ácido pantoténico: 10.000 mg/kg; BHT: 5.000 mg/kg; Biotina: 200 mg/kg; Cobalto: 80 mg/kg; Cobre: 3.500 mg/kg; Colina: 100 g/kg; Ferro: 20 g/kg; Iodo: 160 mg/kg; Inositol: 25 g/kg; Manganês: 10.000 mg/kg; Selênio: 100 mg/kg; Vitamina A: 2.400.000 UI/kg; Vitamina B1: 4.000 mg/kg; Vitamina B2: 4.000 mg/kg; Vitamina B12: 8.000 mcg/kg; Vitamina C: 60 g/kg; Vitamina B2: 4.000 mg/kg; Vitamina B6: 3.500 mg/kg; Vitamina D3: 600.000 UI/kg; Vitamina E: 30.000 UI/kg; Vitamina K3: 3.000 mg/kg; Zinco: 24,00 mg/kg. <sup>2</sup> protegida; <sup>3</sup> areia fina autoclavada.

O arraçoamento foi feito manualmente na proporção de 5% do peso vivo, três vezes ao dia (09:00; 12:30 e 16:00 h), e biometrias eram realizadas quinzenalmente.

### Avaliação de desempenho

Após 45 dias recebendo as dietas experimentais, todos os peixes foram pesados e medidos para avaliação do desempenho, de acordo com os seguintes parâmetros:

- Ganho de peso médio – GPM (g) = [(peso final)/peso inicial] × 100;
- Taxa de crescimento específico – TCE (%/dia) = 100 x (ln peso final - ln peso inicial)/t (dias);
- Taxa de crescimento relativo – TCR (%) = 100× (peso médio final/peso médio inicial);

- Consumo total de ração aparente – CMTR (g) = soma total de alimento consumido no período;
- Conversão alimentar aparente – CAA (%) = [consumo de ração (g)/ganho de peso (g)];
- Sobrevivência – S (%) = [(número total de peixe final/número total de peixes inicial) × 100].

### **Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos**

Amostras de 2 mL de sangue foram obtidas a partir da veia caudal com seringas heparinizadas de 12 peixes de cada tratamento (3 peixes por repetição). A partir destas amostras foi realizada a contagem eritrócitos em câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 400x. A análise do hematócrito foi realizada por centrifugação capilar de acordo com Goldenfarb et al. (1971). Os tubos capilares heparinizados foram preenchidos com amostra de sangue, fechados com um material apropriado e centrifugados a 12.000 x g por 5 minutos (MICROSPIN modelo Spin 1000). A leitura foi feita numa escala padronizada. O índice de hemoglobina foi determinado de acordo com Collier (1944). Foram adicionados 10 µL de sangue a 2 mL de solução de Drabkin, homogeneizados em vortex e a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 540 nm. Os valores dos índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) foram determinados a partir do número de eritrócitos, índice de hemoglobina e hematócrito (WINTROBE, 1934).

O restante do sangue (1 mL) foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos (LABNET modelo Spectrafug C24) para as determinações plasmáticas de glicose, triglicerídeos, proteínas totais, albumina e alanina aminotransferase (ALT), com uso de kits comercial (Labtest® Minas Gerais Brasil) em analisador bioquímico semiautomático marca Doles®, modelo D-250.

### **Avaliação da atividade de enzimas intestinais**

Para determinar as atividades das enzimas intestinais, os tecidos (intestinos) dos peixes (n= 8 por tratamento) foram homogeneizados em tampão (10 mM fosfato/20 mM

tris-pH 7,0) durante 10 minutos (4 °C) utilizando um homogeneizador de tecidos. Os sobrenadantes (extrato de enzima bruto) foram utilizados nos ensaios enzimáticos. A atividade de amilase e lipase foi realizada com uso de kits de diagnóstico Labtest®. A atividade da protease alcalina foi realizada com a utilização da solução de caseína 1% como substrato da reação. A mistura de incubação foi composta de 250-400 µL de azocaseína 1%, tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Após a incubação da mistura por 30 minutos em 35 °C, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 15% e centrifugada a 1.800 x g por 10 minutos. Foi utilizada tirosina como padrão e a unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1 µg de tirosina/minuto (WALTER, 1984).

### **Atividade de lisozima**

A avaliação da atividade de lisozima foi adaptada de Ellis (1990) e Obach et al. (1993), e a lisozima liofilizada (2 mg/mL) de clara de ovo de galinha (Sigma-Aldrich/L4631) foi utilizada como padrão. A curva de calibração foi feita com adição de concentrações de solução de lisozima diluída 1.000 vezes até a obtenção das concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ng e volume completado para 150 µL com tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), com adição 150 µL da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 mg/mL) em tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), obtendo-se um volume final de 300 µL. Como controle foi utilizado o tampão fosfato (300 µL).

Posteriormente, as amostras de plasma foram aquecidas em (banho-maria a 56 °C por 30 minutos) para inativar as proteínas do sistema complemento e para certificar que a lise do *M. lysodeikticus* foi ocasionada exclusivamente por ação da lisozima. Em microplaca de 96 poços, foram adicionados 10 µL de plasma, 140 µL de tampão fosfato de sódio e 150 µL de suspensão *M. lysodeikticus* (0,2 mg/mL) até volume final 300 µL. A absorbância foi medida imediatamente em leitora de placa de Elisa Easys® e mensurada em filtro de 620 nm no tempo zero, e então incubadas durante seis minutos em estufa à 26 °C. A diferença entre a turbidez inicial e final (DO de redução) foi medida entre o tempo zero e seis minutos. Os resultados foram expressos usando os valores de redução de DO para cada volume da amostra (300 µL). A equação de regressão linear da curva de

calibração de lisozima foi utilizada para determinar os níveis de lisozima no soro ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos peixes.

### **Teste de desafio com *Aeromonas* spp.**

Após o término do experimento de desempenho (45 dias), 12 peixes de cada tratamento (3 peixes por repetição) foram inoculados com 0,2 mL de *Aeromonas* spp. preparado com solução salina estéril (0,85%) na concentração  $10^8$  UFC/mL, injetados por via intramuscular laterodorsal direita. Durante o período a partir da inoculação, os animais foram alimentados com as rações experimentais, e avaliados quanto aos sinais clínicos e comportamentais de infecção por *Aeromonas* spp. e sobrevivência durante 14 dias.

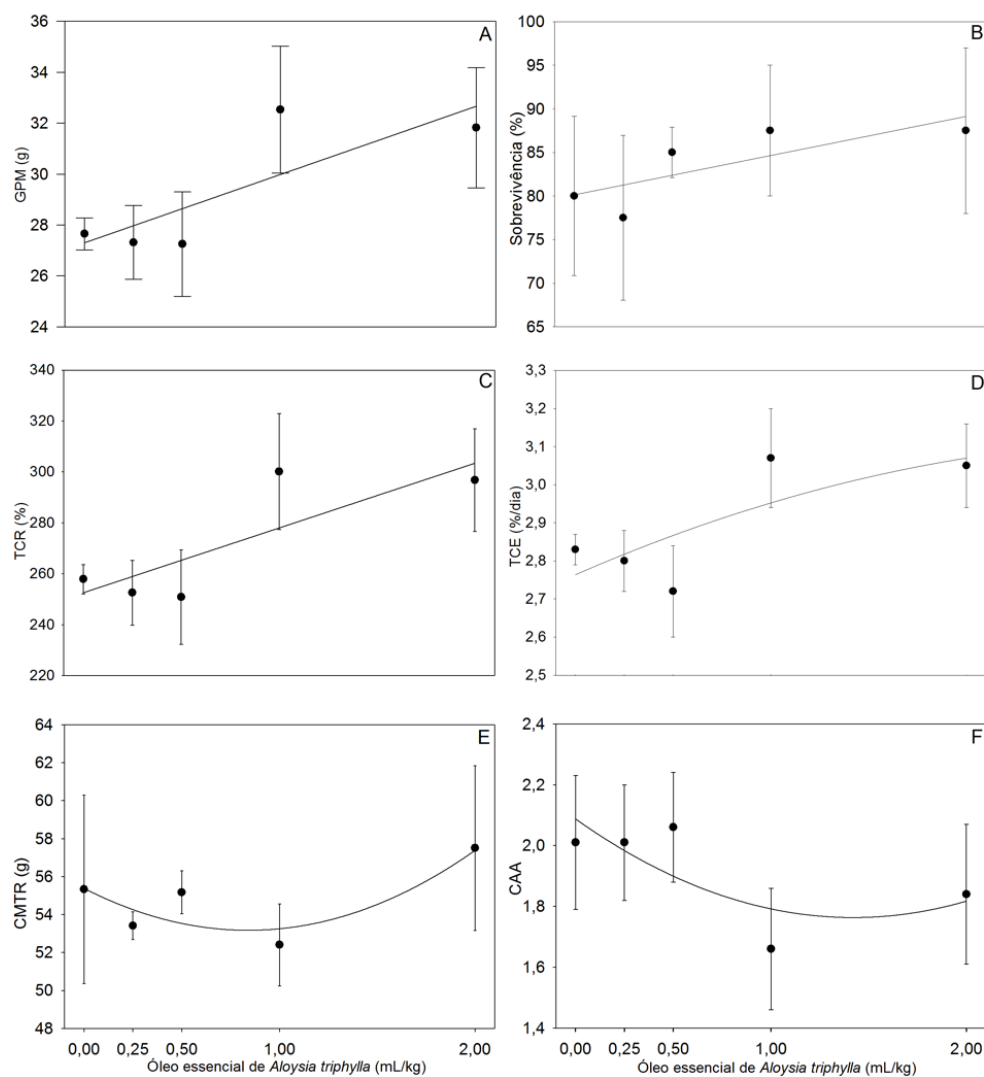
### **Análise estatística**

Os valores estão representados por média  $\pm$  erro padrão. A homogeneidade das variâncias entre os grupos foi testada pelo teste de Levene. O efeito do acréscimo de OEAT na dieta foi verificado através ANOVA one-way, seguida de análise de regressão. Diferenças foram consideradas significativas com  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

Os valores de GPM, sobrevivência, TCR e TCE aumentaram com a adição de OEAT na dieta de juvenis de tilápia do Nilo (Figura 1A, B, C e D). O maior valor de CMTR (Fig. 1E) e o menor valor de CAA (Fig. 1F) ocorreram com o maior nível de inclusão de OEAT na dieta.

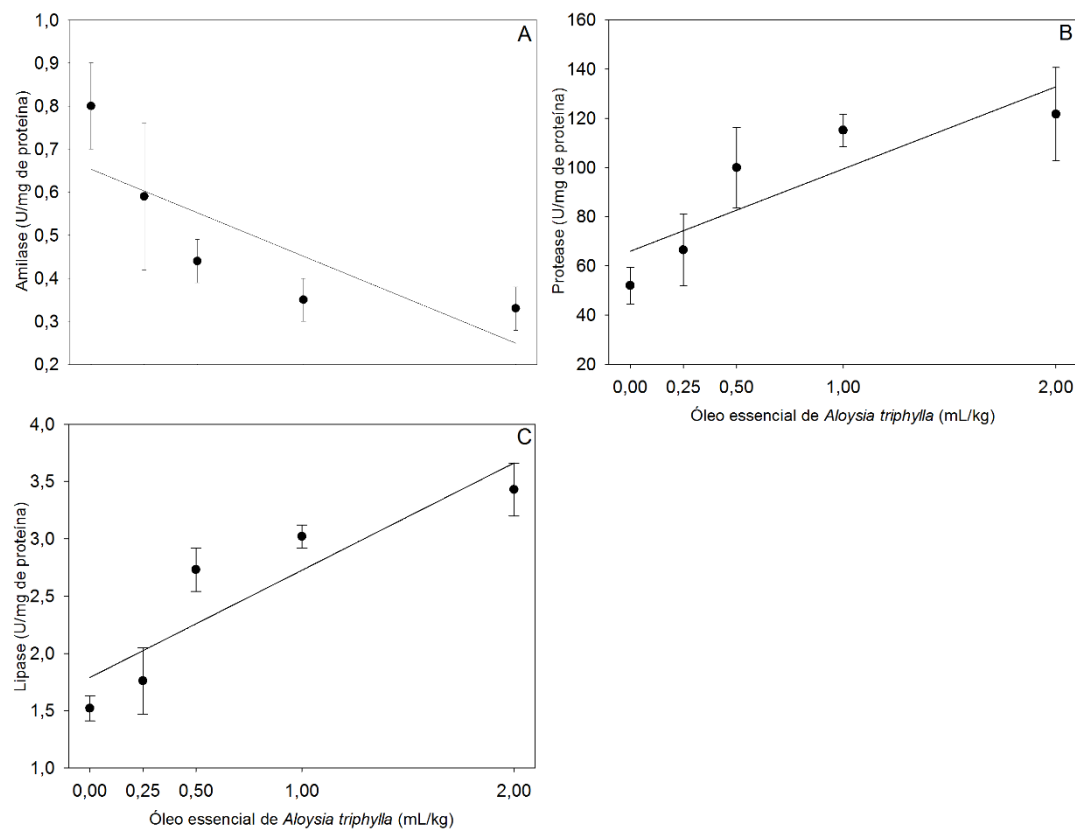
Figura 1: Desenvolvimento de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *A. triphylla* durante 45 dias (n = 40 por tratamento). GPM = Ganho de peso médio. TCR= Taxa de crescimento relativo. TCE=Taxa de crescimento específico. CMTR= Consumo médio total de ração. CAA: Conversão alimentar aparente. A:  $y = -6,351 + 0,242x$ ;  $R^2 = 0,65$ . B:  $y = -10,636 + 0,136x$ ;  $R^2 = 0,61$ . C:  $y = -6,364 + 0,0262x$ ;  $R^2 = 0,67$ . D:  $y = 178,786 - (126,518x) + (22,407x^2)$ ;  $R^2 = 0,69$ . E:  $y = 609,914 - (22,396x) + (0,206x^2)$ ;  $R^2 = 0,94$ . F:  $y = -85,162 + (96,188x) - (26,641x^2)$ ;  $R^2 = 0,66$ .



Os níveis de OEAT influenciaram diferentemente a atividade das enzimas intestinais, ocorrendo redução da atividade da amilase (Fig. 2A) e aumento nas atividades da lipase e protease alcalina com o aumento do nível de inclusão de OEAT na dieta (Fig.

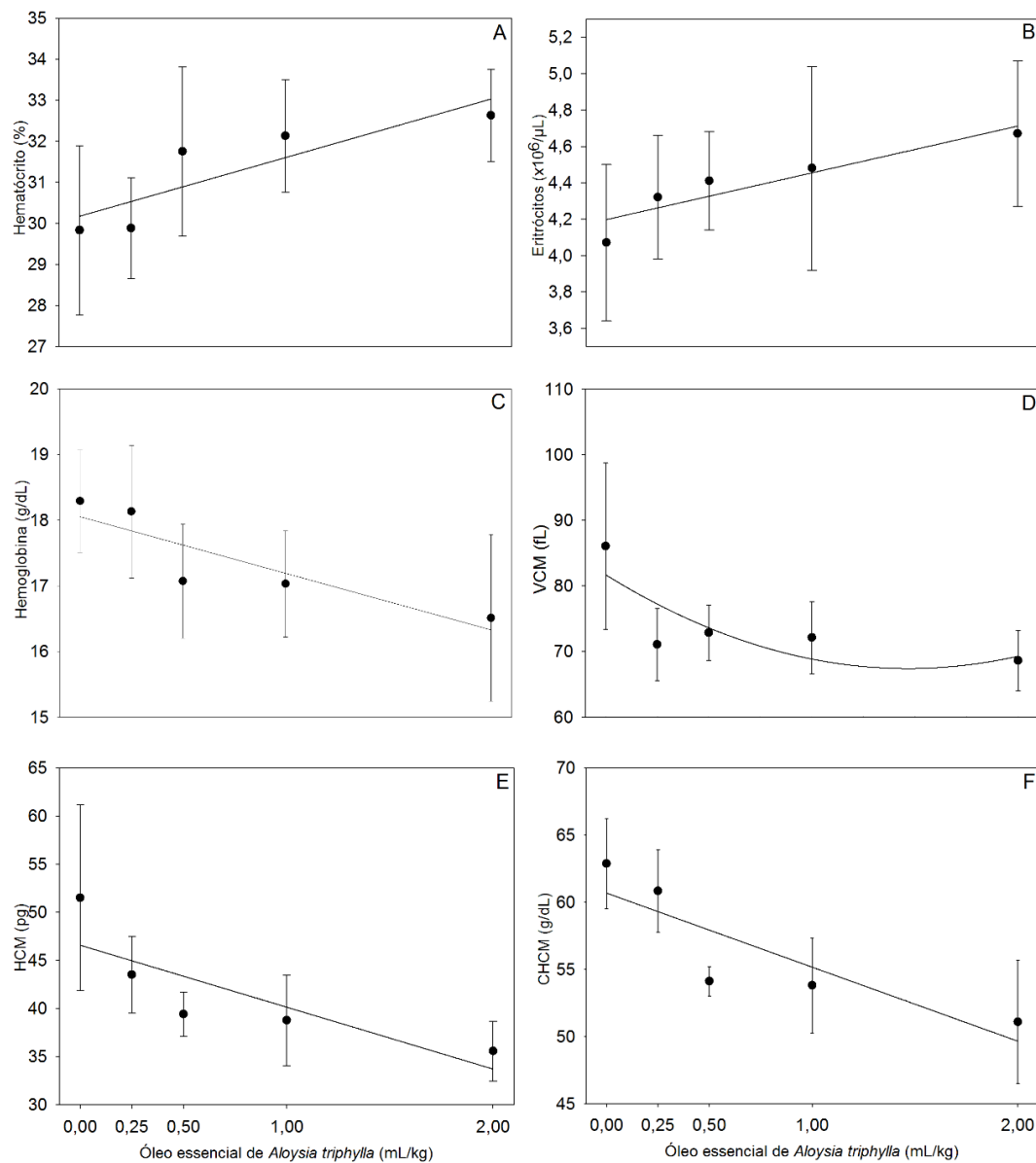
2B e C).

Figura 2: Atividade das enzimas intestinais de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *A. triphylla* durante 45 dias (n = 8 por tratamento). A:  $y = 2,406 - 3,299x$ ;  $R^2 = 0,67$ . B:  $y = -1,291 + 0,0224x$ ;  $R^2 = 0,75$ . C:  $y = -1,413 + 0,868x$ ;  $R^2 = 0,81$ .



O aumento do nível de inclusão de OEAT resultou em aumento proporcional no número de hematócrito e no eritrócitos (Fig. 3A e B) e redução nos parâmetros de hemoglobina, VCM, HCM e CHCM (Fig. 3C, D, E e F).

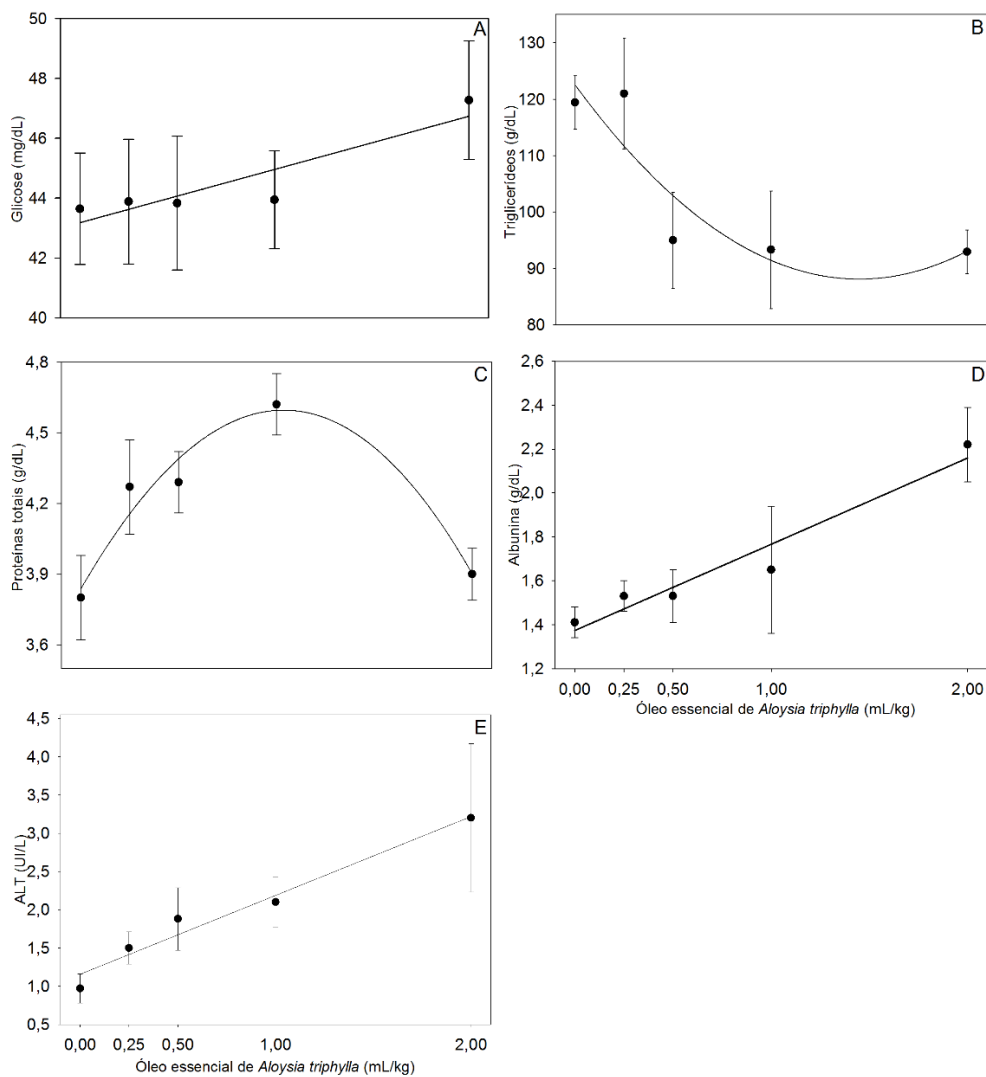
Figura 3: Parâmetros hematológicos de juvenis de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *A. triphylla* durante 45 dias (n = 8 por tratamento). VCM= Volume corpuscular médio. HCM= Hemoglobina corpuscular média. CHCM= Concentração de hemoglobina corpuscular média. A:  $y = -15,600 + 0,523x$ ;  $R^2 = 0,75$ . B:  $y = -13,774 + 3,308x$ ;  $R^2 = 0,85$ . C:  $y = 16,626 - 0,912x$ ;  $R^2 = 0,79$ . D:  $y = 110,672 - 2,769x + 0,0172x^2$ ;  $R^2 = 0,74$ . E:  $y = 5,201 - 0,107x$ ;  $R^2 = 0,69$ . F:  $y = 8,429 - 0,136x$ ;  $R^2 = 0,75$ .





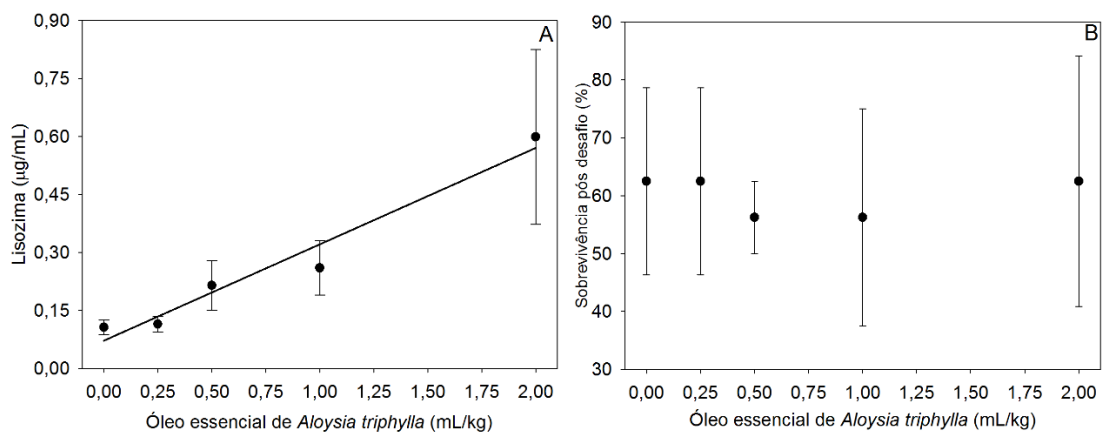
O maior valor de glicose (Fig. 4A) e o menor valor de triglicérideo plasmático (Fig. 4B) ocorreram com o maior nível de inclusão de OEAT na dieta. Para proteínas totais do plasma, ocorreu um pico de concentração no tratamento 1,0 mL/kg de OEAT (Fig. 4C). Os parâmetros albumina e ALT aumentaram proporcionalmente em função do aumento dos níveis de inclusão de OEAT na dieta (Fig. 4D, E).

Figura 4: Parâmetros bioquímicos plasmáticos de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *A. triphylla* durante 45 dias (n = 8 por tratamento). ALT= Alanina amino transferase. A:  $y = 43,179 - 1,778x$ ;  $R^2 = 0,83$ . B:  $y = 194,252 - (3,635x) + (0,0168x^2)$ ;  $R^2 = 0,83$ . C:  $y = 3,8342 + (1,4797x) - (0,7228x^2)$ ;  $R^2 = 0,94$ . D:  $y = -3,250 + 2,398x$ ;  $R^2 = 0,94$ . E:  $y = -1,058 + 0,937x$ ;  $R^2 = 0,97$ .



A atividade de lisozima plasmática aumentou proporcionalmente em função do aumento dos níveis de inclusão de OEAT na dieta (Fig. 5A). Após o período de avaliação de desempenho, a sobrevivência nos peixes infectados com a bactéria *Aeromonas* spp. foram  $62,5 \pm 16,14$ ;  $62,5 \pm 16,14$ ;  $56,25 \pm 6,25$ ;  $56,25 \pm 18,75$  e  $62,5 \pm 21,65$  % respectivamente para os tratamentos 0 (controle); 0,25; 0,5; 1,0 e; 2,0 mL/kg de OEAT na dieta, sem diferença significativa para os tratamentos (Fig. 5B). Além disso, em todos os tratamentos, aproximadamente 25-50% dos peixes apresentaram algum sinal de bacteriose como erosão das nadadeiras, ascite e lesões superficiais, principalmente no local da inoculação.

Figura 5: Atividade de lisozima e sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *A. triphylla* durante 45 dias (n = 8 por tratamento). A:  $y = -0,248 + 3,853x$ ;  $R^2 = 0,96$ .



## DISCUSSÃO

O mecanismo de ação dos óleos essenciais quanto à promoção do crescimento ainda não é claramente elucidado, mas estudos prévios sugerem que envolve estímulo do crescimento através do eixo somatotrófico, composto de hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento de insulina I (IGF-I), fundamentais na regulação e controle do crescimento dos peixes (FOX et al., 2010; QIANG et al., 2012).

O presente estudo demonstrou que o OEAT aumentou o crescimento e a sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo, em que os melhores resultados foram

encontrados com os maiores níveis de adição de OEAT na dieta. Os resultados observados, são consistentes com estudos prévios realizados com jundiá, no qual foi observado maior ganho de peso nos animais alimentados com 2,0 mL/kg de OEAT na dieta (ZEPPEFELD et al., 2015). Similarmente, exemplares de tilápia do Nilo alimentados com dietas suplementadas com o extrato de orégano (*Origanum vulgare*) (0,5%) aumentaram o crescimento e o consumo de ração, devido a capacidade deste em melhorar a eficiência da alimentação (EL ARABY e EL-ARABEY, 2016). Isto está de acordo com os resultados do presente estudo, em que o consumo de ração aumentou a partir da inclusão de 1,0 mL/kg de OEAT na dieta.

A aceitação ou rejeição da dieta envolve quimiorreceptores que incluem a gustação e olfato (HARA, 1994; HOULIHAN et al., 2001). As ervas atuam inicialmente no sabor, influenciando o hábito alimentar, estimula as secreções digestivas e conseqüentemente o consumo total de ração (LEE e GAO, 2012). Em estudo realizado por Hassaan e Soltan (2016) a combinação de *Bacillus licheniformis* com óleo essencial de alho, estimulou o consumo devido ao sabor intenso da alicina o que influenciou o olfato dos animais. Além disso, como a palatabilidade da ração normalmente é observada em função do consumo (CARRASCHI et al., 2011), o resultado deste estudo demonstra a aceitabilidade dos exemplares de tilápia do Nilo pelas dietas com adição de OEAT.

O aumento no crescimento de tilápia do Nilo verificada no presente estudo também se deve a secreção de enzimas intestinais lipase e protease alcalina, as quais promovem aumento das vilosidades intestinais, favorecem melhor absorção dos nutrientes pelo epitélio intestinal e estimulam o apetite (VIDANARACHCHI et al., 2005; RIZZO et al., 2008). Além disso, tais enzimas podem contribuir com a digestão devido ao aumento de ácidos biliares e estímulo pâncreático (BHOSALE et al., 2010; SRINIVASAN, 2005).

No presente estudo, embora a atividade da amilase tenha diminuído com o aumento dos níveis de OEAT, deve-se atentar que a diminuição na atividade específica da amilase é influenciada pelo consumo. O maior consumo em exemplares que receberam dietas suplementadas com níveis mais elevados de OEAT possivelmente forneceu ao intestino maiores quantidades de amido, com produção proporcionalmente insuficiente de amilase em relação à quantidade de substrato existente. Assim, tal redução é uma estratégia para poupar energia e proteína, promovendo maior eficiência na utilização dos

nutrientes pelos peixes, os quais podem ter sido direcionados para o aumento em ganho de peso (MOURA et al., 2007).

Os peixes quando expostos à fitoaditivos, podem apresentar homeostase ou alterações no perfil dos intermediários metabólicos e sanguíneos (TONI et al., 2016). Segundo Tavares-Dias (2015), estas variações refletem entrada, saída e metabolização de nutrientes e permitem avaliar lesões teciduais e funcionamento dos órgãos. Dessa forma, os animais adaptam-se aos desafios nutricionais e fisiológicos.

Aumentos ou decréscimos nas concentrações de hemoglobina, hematócrito, eritrócitos e índices hematimétricos podem ocorrer até mesmo em peixes do mesmo gênero (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Por não haver parâmetros hematológicos de referência claramente definidos nas espécies de teleósteos dificulta-se a avaliação dos resultados acerca destes parâmetros (TAVARES-DIAS, 2015), contudo pode-se inferir que os resultados do presente estudo indicam um efeito correlacionado à adição do OEAT nas dietas, em que o aumento do número total de eritrócitos e do hematócrito, associado à diminuição dos teores de hemoglobina, foram respostas compensatórias à diminuição dos índices hematimétricos.

O hematócrito, a concentração de hemoglobina e a contagem total do número hemácias estão relacionados a capacidade de transporte de oxigênio dos peixes e redução de hematócrito e eritrócitos podem ser indicativos de anemia (VOSYLIENÉ, 1999; SILVA et al., 2012), o que não correu neste estudo. Uma possível explicação para a redução da hemoglobina pode estar relacionada aos compostos fenólicos dos taninos presentes nos óleos essenciais como observado por Afsana et al. (2014) em relação a redução na absorção do ferro em ratos submetidos a 10g/kg de ácido tânico. Yilmaz et al. (2015) não encontraram diferenças nas variáveis hematológicas ao utilizarem níveis de até 5,0 g/kg de carvacrol na dieta de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

O fígado, bem como tecidos extra-hepáticos e vários hormônios desempenham papel fundamental na manutenção da glicemia que pode originar-se da dieta, das reservas de glicogênio ou da gliconeogênese a partir do lactato, aminoácidos e glicerol (SILVEIRA et al., 2009). Toni et al. (2016) observaram aumento nas concentrações de glicose em jundiás expostos ao óleo essencial de *Hesperozygis ringens*, porém não observaram diferenças nos triglicerídeos. Estes autores analisaram as enzimas do metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios e observaram que o metabolismo

intermediário foi afetado pelo aumento nas atividades de FBP (fructose-biphosphatase), G6PDH, (glicose-6-fosfato desidrogenase) e HOAD (3-Hidroxiacil-CoA-desidrogenase), o que levaram a concluir que a via gliconeogênica foi o mecanismo utilizado para a manutenção da homeostase.

Contudo, a magnitude desse aumento está restrita ao intervalo de referência ou pode ser interpretada como leve hiperglicemia (THRALL et al., 2015). O OEAT provocou aumento dos níveis de glicose plasmática, entretanto, tais valores encontram-se dentro daqueles observados (14,1 – 92,1 mg/dL) por Tavares-Dias (2015) para a tilápia do Nilo em condições ótimas quanto a ambiente, nutrição e saúde.

As proteínas totais e suas frações plasmáticas, por sua vez, refletem aspectos nutricionais. O aumento nos níveis de proteínas totais e albumina do plasma neste estudo, também foram verificados com a utilização de 1,0% do extrato de orégano e possivelmente são indicativas do aumento da resposta imune não específica de peixes (POURMOGHIM et al., 2015).

O aumento da atividade de ALT no plasma normalmente está associado a lesões hepáticas, apesar de ocorrer também no músculo, rins, coração e outros tecidos (SOUZA et al., 2015; THRALL et al., 2015). Sendo assim, esta não é totalmente hepatoespecífico, uma vez que a massa muscular total é muito maior que a massa hepática e, por apresentar maior massa que o fígado, pode ser uma fonte potencial de extravasamento (THRALL et al., 2015). Outro fator que deve ser considerado é que os compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais (BAŞER e BUCHBAUER, 2010) podem induzir aumento da atividade da ALT plasmática (GONZÁLEZ e SILVA (2006).

Similarmente, Hassaan et al. (2016) ao avaliarem o óleo essencial de erva doce e alho (1mL/kg) combinados ou separados com *Bacillus licheniformis* ( $7 \times 10^7$ UFC) na dieta de tilápia do Nilo, observaram efeito promotor da atividade da ALT plasmática. Souza et al. (2015) observaram aumento na atividade da ALT plasmática com concentrações de óleo essencial de *Lippia alba* na dieta de jundiás acima de 1,0 mL/kg. Contudo, neste estudo, devido as respostas observadas em relação ao aumento de desempenho, atividade de enzimas intestinais e função imunoestimulante, é possível que o aumento nos níveis de ALT plasmática verificadas nos exemplares de tilápia do Nilo alimentadas com dietas com os maiores níveis de OEAT não tenham gerado lesão tecidual.

O OEAT foi efetivo em aumentar as defesas imunes inespecíficas de tilápia do

Nilo, conforme evidenciado pelo aumento da lisozima plasmática, produzida durante os processos infecciosos.

A lisozima possui atividade lítica em bactérias através da separação de ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas no peptidoglicano das paredes celulares bacterianas, resultando em bacteriólise (SAURABH e SAHOO, 2008; POURMOGHIM et al., 2015).

Estudos prévios também demonstraram que a adição de fitogênicos à dieta de peixes possuem efeito imunomodulador, com o aumento da atividade da lisozima plasmática. Isto foi verificado por Acar et al. (2015) com 1,0; 3,0 e 5 mL/kg de óleo essencial da casca da laranja na dieta de tilápia Moçambique e por Diler et al. (2016) com óleo essencial de orégano (3,0 mL/ kg) na dieta de truta arco-íris. Yin et al (2006) alimentaram tilápias do Nilo com 1,0; 5,0 e 10% de extratos de *Astragalus radix* e *Scutellaria radix* durante quatro semanas. A atividade de lisozima foi aumentada logo na primeira semana com *A. radix*, entretanto com *S. radix* não houve efeito.

A adição de 0,25 e 0,5 mL/kg de carvacrol na dieta de robalos *Dicentrarchus labrax* não resultou em efeito imunomodulador (VOLPATTI et al., 2012), o que neste caso pode ter sido influenciado por uma baixa concentração de carvacrol na dieta. Apesar dos benefícios causados por compostos derivados de plantas para aumentarem ou estimularem a função imune, relatos sobre como ocorre a modulação são escassos (YIN et al., 2016).

Apesar das alterações metabólicas observadas no presente estudo, os parâmetros hemato-bioquímicos estiveram semelhantes ou próximos aos descritos para tilápia do Nilo criadas em condições intensivas nutricional e ambiental adequadas (TAVARES-DIAS (2015). Estas alterações não foram prejudiciais ao desempenho dos juvenis de tilápia do Nilo neste estudo, pois os exemplares apresentaram-se saudáveis, sem manifestações de doenças durante o período de avaliação de desempenho. Adicionalmente, segundo Waagbø (1994), aumento na resposta imune é importante para avaliar a adição de nutrientes à dieta de peixes.

Além do papel imunomodulador, a adição de óleos essenciais na dieta de peixes pode melhorar a saúde e a resistência a micro-organismos patogênicos (SHEHATA et al., 2013; GÜLTEPE et al., 2014; STARLIPER et al., 2015; SUTILI et al., 2015). No presente estudo, o OEAT não foi capaz de interferir na sobrevivência dos peixes.

Diferentemente deste estudo, aumento da sobrevivência em desafio bacteriano foi

verificado por Santos et al. (2017) com uso de 2,0 mL/kg de OEAT em jundiás desafiados com *A. hydrophila* e por Acar et al. (2015) com 1,0% de óleo essencial da casca de laranja em exemplares de tilápia Moçambique desafiadas com *Streptococcus iniae*. Assim, a diversidade de respostas frente aos desafios com patógenos pode estar relacionada a fatores intrínsecos dos óleos essenciais (constituintes ativos, espécie vegetal e parte da planta utilizada além das condições climáticas de cultivo e coleta) (APPLEGATE et al., 2010).

## CONCLUSÃO

A suplementação de 2 mL/kg de OEAT na dieta de juvenis de tilápia do Nilo apresenta-se como promissor promotor de crescimento e imunoestimulante, contudo, não influenciou na sobrevivência em situação de desafio com *Aeromonas* spp.

## AGRADECIMENTOS

A Codevasf, Petrolina-PE, pela doação dos peixes e pelo fornecimento de estrutura para realização do experimento em parceria com a Embrapa Semiárido. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto e a Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa concedida a RCS.

## REFERÊNCIAS

ACAR, Ü.; KESBIÇ, O. S.; YILMAZ, S.; GÜLTEPE, N.; TÜRKER, A. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, v. 437, p. 282-286, 2015.

AFSANA, K.; SHIGA, K.; ISHIZUKA, S.; HARA, H. Reducing effect of ingesting tannic acid on the absorption of iron, but not of zinc, copper and manganese by rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, p. 584-592, 2014.

ALY, S.M.; ALBUTTI, A.S.; RAHMANI, A.H.; ATTI, N.M.A. The response of New-season Nile tilapia to *Aeromonas hydrophila* vaccine. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, p. 4508-4514, 2015.

APPLEGATE, T.J.; KLOSE, V.; STEINER, T.; GANNER, A.; SCHATZMAYR, G. Probiotics and phytogenics for poultry: Myth or reality? **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, p. 194-210, 2010.

BAŞER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: Science, technology and applications**. Taylor and Francis; New York: 2010. 994p.

BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, v. 63, p. 281-284, 2006.

BHOSALE, S.V.; BHILAVE, M.P.; NADAF, S.B. Formulation of fish feed using ingredients from plant sources. **Research Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, p. 284-287, 2010.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C.; ARAÚJO, L.D. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.357-362, 2004.

CARRASCHI, S.P.; CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J.G.; CASTRO, M.P.; BORTOLUZZI, N.L.; GÍRIO, A.C.F. Efficacy of the florfenicol and of the oxytetracycline in the control in *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 579-583, 2011.

COGLIANI, C.; GOOSSENS, H.; GREKO, C. Restricting antimicrobial use in food animals: Lessons from Europe. **Microbe**, v. 6, p. 274-279, 2011.

COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian**



**Medical Association Journal**, v. 50, p. 550-552, 1944.

DILER, O.; GORMEZ, O.; DILER, I.; METIN, S. 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). **Aquaculture Nutrition**, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/anu.12451>>. Acesso em: 27 mar. 2017.

EL ARABY, D.A.; EL-ARABEY, A.A. New Approach to use *Origanium vulgare* extract as immunostimulant to increase resistance to *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas flourescence*. **Journal of Marine Science: Research & Development**, v. 6, p. 1-5, 2015.

ELLIS, A.E. **Lysozyme assays**. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERSON, B.S. and VAN MUISWINKEL, W.B. Eds., Techniques in fish immunology fair Haven, SOS Publications, Fair Haven, p.101-103, 1990.

EL-SAYED, A. **Tilapia culture**. Wallingford, UK, p.139-159, 2006.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 2016. 200 p.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.

FOX, B.K.; BREVES, J.P.; DAVIS, L.K.; PIERCE, A.L.; HIRANO, T.; GRAU, E.G. Tissue-specific regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during fasting and re-feeding: Importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II mRNA in the tilapia. **General and Comparative Endocrinology**, v. 166, p. 573-580, 2010.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2ª Ed. Porto Alegre, Editora UFRGS, 2006.

GÜLTEPE, N.; BILEN, S.; YILMAZ, S.; GÜROY, D.; AYDIN, S. Effects of herbs and spice on health status of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) challenged with *Streptococcus iniae*. **Acta Veterinária Brasilica**, v. 83, p. 125-131, 2014.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M-S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture**, v. 317, p. 1-15, 2011.

HASSAAN, M.S.; SOLTAN, M.A. Evaluation of essential oil of fennel and garlic separately or combined with *Bacillus licheniformis* on the growth, feeding behaviour, hemato-biochemical indices of *Oreochromis niloticus* (L.) Fry. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 07, p. 1-8, 2016.

HARA, T. Olfaction and gustation in fish: an overview. **Acta Physiology Scandinavica**, v.152, p.207-217, 1994.

HOHLENWERGER, J.C.; COPATTI, C.E.; SENA, A.C.; COUTO, R.D.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D. Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)? **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 49, p. 119-126, 2016.

HOULIHAN, D.; BOUJARD, T.; JOBLING, M. (ed.). **Food intake in fish**. Oxford; Malden, MA: Blackwell Science, 2001. Disponível em:  
<http://agrifs.ir/sites/default/files/Food%20Intake%20in%20Fish.pdf>. Acessado em: 09.04.2017.

IGUCHI, K.; ICHIRO; OGAWA, K.; NAGAE, M.; ITO, F. The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus Altivelis*).

**Aquaculture**, v. 220, p. 515-523, 2003.

LEE, J. H.; CHO, S.; PAIK, H. D.; CHOI, C. W.; NAM, K. T.; HWANG, S. G.; KIM, S. K. Investigation on antibacterial and antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of some thai edible plants as an alternative for antibiotics. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, p. 1461-1468, 2014.

METÓN, I.; SALGADO, M.C.; ANEMAET, I.G.; GONZÁLEZ, J.D.; FERNÁNDEZ, F.; BAANANTE, I.V. Alanine aminotransferase: A target to improve utilisation of dietary nutrients in aquaculture. Recent advances in pharmaceutical sciences. **Research Signpost** v. 37, p. 133-148, 2015.

MOURA, G.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; LANNA, E.T.A.; JÚNIOR, A.M.; MACIEL, C.M. R. R. Desempenho e atividade de amilase em tilápias-do-nilo submetidas a diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1609-1615, 2007.

OBACH, A.; QUENTEL, C.; LAURENCIN, F.B. Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 15, p. 175-185, 1993.

PARODI, T.V.; VARGAS, A.P.C.; KREWER, C.; FLORES, E.M.M.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; OLIVEIRA, J.V.; POPIOLSKI, A.S.; MINOZZO, M. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO<sub>2</sub> extraction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 283-292, 2013.

POURMOGHIM, H.; HAGHIGHI, M.; ROHANI, M.S. Effect of dietary inclusion of *Origanum vulgare* extract on nonspecific immune responses and hematological Parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 4, p. 33-39, 2015.

QIANG, J.; YANG, H.; WANG, H.; KPUNDEH, M.D.; XU, P. Growth and IGF-I

response of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) to changes in water temperature and dietary protein level. **Journal of Thermal Biology**, v. 37, p. 686-695, 2012.

RIZZO, P.V.; MENTEN, J.F. M.; RACANICCI, A.M. C.; SANTAROSA, J. Foundation and perspectives of the use of plant extracts as performance enhancers in broilers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 10, p. 195-204, 2008.

SANTOS, A.C.; SUTILI, F.J.; HEINZMANN, B.M.; CUNHA, M.A.; BRUSQUE, I. C. M.; BALDISSEROTTO, B.; ZEPPENFELD, C.C. *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: Blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 62, p. 213-216, 2017.

SAURABH, S.; SAHOO, P.K. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate Immune System. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 223-239, 2008.

SENA, A.C.; TEIXEIRA, R.R.; FERREIRA, E.L.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D.; COUTO, R.D.; COPATTI, C.E. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 465, p. 374-379, 2016.

SHAKYA, S.R.; LABH, S.N. Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 2, p. 44-47, 2014.

SHEHATA, S.A.; MOHAMED, M.S.; ABD EL-SHAFI, S. Antibacterial activity of essential oils and their effects on Nile tilapia fingerlings performance. **Journal Medical Science**, v.13, p. 367-372, 2013.

SILVA, A.S.E.; LIMA, T.A.X.; BLANCO, B.S. Hematologia em peixes (Revisão bibliográfica). **Revista Centauro**, v.3, p. 24-32, 2012.

SILVEIRA, U.S.; LOGATO, P.V.R.; PONTES, E.C. Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, p. 817-836, 2009.

SOUZA, C.F.; SALBEGO, J.; GRESSLER, L.T.; GOLOMBIESKI, J.I.; FERST, J. G.; CUNHA, M.A.; HEINZMANN, B.M.; CARON, B.O.; GLANZNER, W.G.; GONÇALVES, P.B.D.; BALDISSEROTTO, B. *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard 1824), submitted to a stressful condition: effect of dietary addition of the essential oil of *Lippia alba* on metabolism, osmoregulation and endocrinology. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, p. 707-714, 2015.

SRINIVASAN, K. Spices as influencers of body metabolism: An overview of three decades of Research. **Food Research International**, v. 38, p. 77-86, 2005.

STARLIPER, C.E.; KETOLA, H.G.; NOYES, A.D.; SCHILL, W.B.; HENSON, F.G.; CHALUPNICKI, M.A.; DITTMAN, D.E. An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 89-97, 2015.

SUTILI, F.J.; SLIMA SILVA, L.; GRESSLER, L.T.; BATTISTI, E.K.; HEINZMANN, B.M. VARGAS, A.C.; BALDISSEROTO, B. Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: *in vitro* activity and their use in experimentally infected fish. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, p. 47-54, 2015.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G.; MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004. 144 p.

TAVARES-DIAS. **Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes**

**cultivados.** In: Tavares-Dias, M. & Mariano, W.S. (Org.). *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas.* São Carlos, Editora Pedro & João, 2015.

TEIXEIRA, R. R.; DE SOUZA, R. C.; SENA, A. C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M.; COUTO, R. D.; COPATTI, C. E. Essential Oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: Anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research**, 2016. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/are.13165>>. Acessado: 09.12.16, doi: 10.1111/are.13165.

TONI, C.; MARTOS-SITCHA, J. A.; RUIZ-JARABO, I.; MANCERA, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; PINHEIRO, C. G.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Stress response in silver catfish (*Rhamdia quelen*) Exposed to the essential oil of *Hesperozygis ringens*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 129-138, 2015.

THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária.** 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca, 2015, 678 p. 2015.

VIDANARACHCHI, J. K.; MIKKELSEN, L. L.; SIMS, I.; IJI, P. A.; CHOCT, M. Phytobiotics: alternatives to antibiotic growth promoters in monogastric animal feeds. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**, v. 15, p. 131-144, 2005.

VOLPATTI, D.; CHIARA, B.; FRANCESCA, T.; MARCO, G. Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella (Vibrio) anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 31-44, 2012.

VOSYLIENÉ, M.Z., The effects of heavy metals on haematological indices of fish (Survey). **Acta Zoologica Lituanica**. v. 9, p.76-82, 1999.

WAAGBØ, R. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 25, p.

175-197, 1994.

WALTER, H.E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. (Ed). *Methods of enzymatic analysis*. Vol. V. Verlag Chemie. Weinheim. 1984, p.270-277.

WINTROBE, M. M. Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v. 51, p.32-49, 1934.

YILMAZ, E.; ERGÜN, S.; ILMAZ, S. influence of carvacrol on the growth performance, hematological, non-specific immune and serum biochemistry parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Food and Nutrition Sciences**, v. 06, p. 523-531, 2015.

YIN, G.; JENEY, G.; RACZ, T.; XU, P.; JUN, X.; JENEY, Z. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis Niloticus*. **Aquaculture**, v. 253, n. p. 39-47, 2006.

ZEPPENFELD, C.C; HERNANDEZ, D.R; SANTINON, J.J; HEINZMANN, B.M; CUNHA, M.A; SCHMIDT, D.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 933-940, 2015.

### CAPÍTULO 3

---

**Óleo essencial de *Lippia alba* na alimentação de juvenis de tilápia do Nilo e seu efeito após inoculação com *Aeromonas* spp.**



**Óleo essencial de *Lippia alba* na alimentação de juvenis de tilápia do Nilo e seu efeito após inoculação com *Aeromonas* spp.**

**RESUMO**

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia alba* (OELA), no desempenho, hematologia, parâmetros bioquímicos e imunológicos e resistência à infecção por *Aeromonas* spp. Os peixes (n=300) foram divididos aleatoriamente em 20 caixas de 1000 L. Os níveis de OELA na dieta foram: 0 (controle); 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mL/kg. Ao final de 45 dias, foi realizada biometria e determinação de hematócrito, hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulina e relação albumina/globulina, além da atividade de lisozima do plasma (n=12 peixes por tratamento). Adicionalmente, realizou-se desafio pela inoculação da bactéria *Aeromonas* spp. para avaliação de sobrevivência por um período de 14 dias (n=28 peixes por tratamento). Não houve mortalidade durante o período do desempenho. O ganho de peso médio aumentou nas maiores concentrações de OELA utilizadas. As maiores concentrações de OELA na dieta aumentaram hematócrito, hemoglobina, glicose, colesterol, albumina, relação albumina/globulina e lisozima do plasma; e reduziram as concentrações de CHCM, triglicerídeos, proteínas totais e globulina do plasma. A sobrevivência de peixes após infecção de *Aeromonas* spp. aumentou proporcionalmente com o aumento do OELA na dieta. Conclui-se que a suplementação de 1,0 a 2,0 mL/kg de OELA na dieta é benéfico ao desenvolvimento de juvenis de tilápia do Nilo, pois apresentou papel imunoestimulante, não provocou alterações metabólicas e promoveu aumento de crescimento, além de contribuir para o aumento da sobrevivência em desafio com *Aeromonas* spp.

**Palavras-chave:** Desempenho, imunoestimulante, lisozima, parâmetros bioquímicos, sobrevivência.

**Nutritional effect of *Lippia alba* essential oil on juvenile Nile tilapia on growth, metabolism, hematological parameters and response to challenge with *Aeromonas* spp.**

**ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of different concentrations of essential oil of *Lippia alba* (EOLA) on performance, hematology, biochemical and immunological parameters and resistance to infection by *Aeromonas* spp. Fish (n = 300) were randomly divided into 20 tanks (1000 L). EOLA levels in the diet were: 0 (control); 0.25; 0.5; 1.0 and 2.0 mL/kg. At the end of 45 days, biometrics and hematocrit, hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin (MCH) and glucose, cholesterol, triglycerides, total proteins, albumin, globulin and albumin/globulin ratio and plasma lysozyme activity were determined (n = 12 fish per treatment). In addition, challenge was carried out by the inoculation of the bacterium *Aeromonas* spp. For survival evaluation over a period of 14 days (n = 28 fish per treatment). There was no mortality during the performance period. The mean weight gain increased at the highest EOLA concentrations used. The highest concentrations of OELA in the diet increased hematocrit and hemoglobin and plasma glucose, cholesterol, albumin, albumin/globulin ratio and lysozyme and reduced the concentration of MCH and plasma triglycerides, total proteins and globulin. The survival of fish after infection of *Aeromonas* spp. increased proportionally with the increase in EOLA in the diet. It is concluded that the supplementation of 1.0 to 2.0 mL/kg of EOLA in the diet is beneficial to the development of juvenile Nile tilapia, since it presented immunostimulatory role, did not provoke metabolic alterations and promoted growth increase, besides contributing to increase survival in challenge with *Aeromonas* spp.

**Key words:** Performance, immunostimulant, lysozyme, biochemical parameters, survival.

## INTRODUÇÃO

A piscicultura representa um dos setores da produção animal que mais cresce no mundo (FAO, 2016). Um dos principais entraves para sua expansão em cultivos intensivos é a presença de doenças infecciosas (VASEEHARAN e THAYA, 2014), como as causadas por bactérias do gênero *Aeromonas* spp.

*Aeromonas* spp. são micro-organismos oportunistas e frequentemente causam doenças quando os peixes se encontram imunossuprimidos por condições ambientais adversas, deficiências nutricionais, altas densidades de estocagem, manipulação excessiva, transporte prolongado, lesões mecânicas, dentre outros (FIGUEIREDO e LEAL, 2008). Alguns sintomas ligados a esta bacteriose causam lesões superficiais ou úlceras mais profundas na pele, pontos hemorrágicos em várias áreas do corpo, abdômen distendido, exoftalmia, inapetência, podendo ocasionar até a morte dos animais (PAVANELLI et al, 2008).

A imunonutrição com uso de fitoaditivos como óleos essenciais é uma abordagem com ações dirigidas a maximizar as funções metabólicas de maneira a contribuir para o bem-estar dos peixes, pois os mesmos atuam como promotores de crescimento, imunostimulantes e na prevenção de doenças (VASEEHARAN e THAYA, 2014; STARLIPER et al., 2015; ZEPPEFELD et al., 2015), servindo como alternativa ao uso de antibióticos sintéticos.

O desempenho de peixes têm sido tradicionalmente avaliado com base em variáveis zootécnicas como ganho de peso, comprimento, taxa de sobrevivência, ou eficiência na utilização dos alimentos como conversão alimentar e taxa de eficiência proteica (BUYUKCAPAR et al., 2011; ALI et al., 2015), os quais são muito úteis em uma primeira avaliação da produtividade piscícola. Entretanto, além destas, para a melhor compreensão do desenvolvimento dos peixes, o estudo de variáveis bioquímicas e hematológicas assume relevante importância para a avaliação do estado de hígidez dos mesmos (TAVARES-DIAS, 2015).

Quando expostos a doenças infecciosas, como resposta, os organismos ativam o sistema imunológico, alterando o aparato celular hematológico e bioquímico (BOON et al., 1990) para sua melhor adaptação. Desta forma, a avaliação de parâmetros imunológicos contribui para melhor compreensão da saúde dos peixes. A utilização de

compostos como os óleos essenciais adicionados à dieta é uma alternativa viável para promover o crescimento e melhorar a saúde de peixes devido ao seu papel imunomodulador (ASSEM et al., 2005; ABREU et al., 2009).

*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) é encontrada em diversas regiões brasileiras sob diferentes denominações: erva-cidreira, falsa-melissa, chá-de-tabuleiro, erva cidreira-do-campo, salva-do-Brasil, salva-limão e erva-cidreira-brava, alecrim-do-mato etc (JANNUZZI et al., 2011). É frequentemente utilizada na medicina popular devido às propriedades calmantes, analgésicas, anti-inflamatórias, antipiréticas, sedativas e expectorantes (TAVARES et al., 2011). Adicionalmente, uma grande vantagem na utilização desta espécie está relacionada à sua capacidade de colonização e ao seu crescimento rápido (YAMAMOTO et al., 2008), o que favorece a elaboração de produtos como os óleos essenciais.

O óleo essencial de *L. alba* (OELA) contém diversos compostos bioativos (HOHLENWERGER et al., 2016) e estudos recentes demonstraram efeitos benéficos como antioxidantes, antimicrobianos (MACHADO et al., 2014) e promotores de crescimento em jundiá (*Rhamdia quelen*) (AZAMBUJA et al., 2011; SUTILI et al., 2015). Entretanto, Saccol et al. (2013) verificaram que OELA não produziu efeito promotor de crescimento em jundiás, mas implicou em efeito antioxidante. Portanto, faz-se necessário ampliar a investigação do efeito do OELA sobre a fisiologia nutricional em outras espécies de peixes, como tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Características como rusticidade, taxa de crescimento rápido, plasticidade dietária, elevada adaptabilidade a condições ambientais adversas, bem como a preferência de seu filé pelo mercado consumidor, fazem da tilápia do Nilo uma das espécies de água doce de maior importância na aquicultura mundial (EL-SAYED, 2006; FERREIRA et al., 2011; YAKUBU et al., 2014; HOHLENWERGER et al., 2016). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inclusão de diferentes níveis de OELA na dieta de juvenis de tilápia do Nilo em relação a parâmetros de crescimento, hematológicos, metabólicos, imunoestimulantes e resistência à infecção bacteriana com *Aeromonas* spp.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção do óleo essencial de *Lippia alba*

Foram utilizadas folhas de *L. alba* cultivadas em Frederico Westphalen, região Sul do Brasil. O OELA foi obtido da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFSM), Brasil, e armazenado em frascos de vidro âmbar até a sua utilização. Sua densidade era de aproximadamente 0,9 g/mL. O principal constituinte químico de OELA usado neste estudo é o linalool (81,64%) (cap. 1).

### Local, animais experimentais e condições de cultivo

O ensaio foi realizado nas instalações do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Codevasf (CIRPA) região Nordeste do Brasil de onde foram obtidos os juvenis de tilápia do Nilo ( $16,24 \pm 0,10$  g;  $10,21 \pm 0,02$  cm) aclimatados às condições laboratoriais e à dieta basal por 10 dias em caixas de 1.000 L (n=15). O sistema possuía fluxo de água contínuo, com realização de uma sifonagem diária, com limpeza das paredes das caixas, semanalmente. Os procedimentos de manejo dos animais e coleta de amostras biológicas foi aprovado pelo Comitê em Experimentação Animal da UFBA/Instituto de Biologia sob nº 22/2015.

Parâmetros físico-químicos da água foram monitorado e mantidos em pH (~7,6) com uso de pHmetro (Hanna - HI 98130), temperatura (~25,0 °C) e oxigênio dissolvido (>5,0 mg/L) com uso de oxímetro (Politerm-POL 60) e amônia total (<0,10 mg/L N-NH<sub>3</sub>) por kit de aquicultura (Alfatecnoquímica, Florianópolis, SC, Brasil).

### Formulação, elaboração das dietas e desenho experimental

Os peixes foram divididos aleatoriamente em cinco tratamentos com quatro repetições. Quatro dietas com adição de níveis de OELA de 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mL/Kg e uma dieta controle (isenta do OELA) foram formuladas conforme a exigência para a espécie (Tabela 1). As concentrações de OELA na dieta foram definidos de acordo com Saccol et al. (2013). Os ingredientes foram finamente moídos e misturados e OELA foi

adicionado juntamente com óleo de soja. Posteriormente os ingredientes foram umedecidos, peletizados em uma peletizadora elétrica experimental (máquina tipo moedor de carnes), secos em estufa de ventilação forçada a 35 °C e triturados em granulometria adequada. Os pellets foram armazenados em recipientes herméticos isentos de iluminação em um freezer a -20 °C até sua utilização.

**Tabela 1:** Composição percentual da dieta basal.

Ingredientes	%
Farelo de soja (45%)	52,00
Fubá de milho	25,40
Farinha de peixe (55%)	9,73
Farinha de trigo	10,00
Fosfato bicálcico	0,50
Óleo de Soja	0,83
Premix <sup>1</sup>	0,50
Sal	0,50
Vitamina C <sup>2</sup>	0,20
Butil Hidroxi- Tolueno	0,02
Propionato de Cálcio	0,10
Inerte <sup>3</sup>	0,22

<sup>1</sup>Ácido Fólico:1.200 mg/kg; Ácido Nicotínico: 20 g/kg; Ácido pantoténico: 10.000 mg/kg; BHT: 5.000 mg/kg; Biotina: 200 mg/kg; Cobalto: 80 mg/kg; Cobre: 3.500 mg/kg; Colina: 100 g/kg; Ferro: 20 g/kg; Iodo: 160 mg/kg; Inositol: 25 g/kg; Manganês: 10.000 mg/kg; Selênio: 100 mg/kg; Vitamina A: 2.400.000 UI/kg; Vitamina B1: 4.000 mg/kg; Vitamina B2: 4.000 mg/kg; Vitamina B12: 8.000 mcg/kg; Vitamina C: 60 g/kg; Vitamina B2: 4.000 mg/kg; Vitamina B6: 3.500 mg/kg; Vitamina D3: 600.000 UI/kg; Vitamina E: 30.000 UI/kg; Vitamina K3: 3.000 mg/kg; Zinco: 24,00 mg/kg. <sup>2</sup>protegida; <sup>3</sup>areia fina autoclavada.

### Manejo alimentar e desempenho zootécnico

Antes do fornecimento das dietas experimentais, os animais passaram por um jejum prévio de 24 h. Os peixes foram alimentados com cada dieta durante 45 dias, três vezes ao dia (às 08:30, 12:30 e 16:30 h) diariamente com 5% do peso vivo. Após o período experimental, realizou-se biometria (peso e comprimento) para avaliação do desempenho de ganho de peso médio (GPM), taxa de conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de crescimento relativo (TCR) e Índice

hepatossomático (IHS), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{GPM (g)} = [(\text{peso final}) / \text{peso inicial}] \times 100$$

$$\text{CAA (\%)} = [\text{consumo de ração (g)} / \text{ganho de peso (g)}]$$

$$\text{TCE (\% dia)} = 100 \times (\ln \text{Peso Final} - \ln \text{Peso Inicial}) / t \text{ (dias)}$$

$$\text{TCR (\%)} = 100 \times (\text{peso médio final} / \text{peso médio inicial})$$

$$\text{IHS (\%)} = (\text{peso total fígado (g)} / \text{peso total do indivíduo (g)}) \times 100$$

### **Análises bioquímicas e hematológicas**

Para as análises sanguíneas e bioquímicas, três peixes/repetição ( $n = 12$  peixes por tratamento) foram coletados. As amostras de sangue (1,5 mL) foram realizadas por venopunção caudal com seringas heparinizadas e transferidas para microtubos de 2 mL. Alíquotas de sangue foram tomadas para análise de hematócrito, em que os tubos capilares heparinizados foram preenchidos com amostra de sangue, sendo fechados com material apropriado e centrifugados a  $12.000 \times g$  durante 5 minutos (MICROSPIN modelo SPIN 1000), sendo a leitura realizada numa escala padronizada (GOLDENFARB et al., 1971). A análise de hemoglobina foi determinada de acordo com Collier (1944), em que foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de sangue a 2 mL de solução de Drabkin, homogeneizados em vortex e a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 540 nm. A concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) foi determinada a partir de índice de hemoglobina e hematócrito.

Cerca de 1,2 mL do sangue restante foi centrifugado a  $10.000 \times g$  durante 5 min (LABNET modelo Spectrafug C24) para obtenção de plasma para determinação da glicose, colesterol, proteínas totais, globulina, albumina e triglicerídeos por meio de kits de diagnóstico Labtest<sup>®</sup> em analisador bioquímico semiautomático marca Doles<sup>®</sup>, modelo D-250. Através da divisão entre albumina e globulina obteve-se o cálculo da relação albumina/globulina.

### **Parâmetro imune não específico - atividade de Lisozima**

A mensuração da atividade de lisozima sérica foi adaptada de Ellis (1990) e Obach et al. (1993). Como padrão foi utilizada a lisozima liofilizada (2 mg/mL) de clara de ovo

de galinha (Sigma-Aldrich/L4631). A curva de calibração foi realizada com adição de concentrações de solução de lisozima diluída 1.000 vezes até a obtenção das concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300  $\eta$ g e volume completado para 150  $\mu$ L com tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), com adição 150  $\mu$ L da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 mg/mL) (Sigma-Aldrich ATCC 4698) em tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), obtendo-se um volume final de 300  $\mu$ L. O tampão fosfato (300  $\mu$ L) foi utilizado como controle.

As amostras de plasma foram aquecidas (banho-maria a 56 °C por 30 minutos) para inativar as proteínas do sistema complemento e para assegurar que a lise do *M. lysodeikticus* foi ocasionada exclusivamente por ação da lisozima. Em microplaca de 96 poços, foram adicionados 10  $\mu$ L de plasma, 140  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio e 150  $\mu$ L de suspensão *M. lysodeikticus* (0,2 mg/mL) até volume final 300  $\mu$ L. A absorbância foi imediatamente medida em seguida em leitora de placa de Elisa Easys® e mensurada em filtro de 620 nm no tempo zero, e então incubadas durante seis minutos em estufa à 26 °C. A diferença entre a turbidez inicial e final (DO de redução) foi medida entre o tempo zero e seis minutos.

Os resultados foram expressos usando os valores de redução de DO para cada volume da amostra (300  $\mu$ L). A equação de regressão linear da curva de calibração de lisozima foi utilizada para determinar os níveis de lisozima ( $\mu$ g/mL) no soro dos peixes.

### **Infecção experimental com *Aeromonas* spp.**

A infecção experimental por injeção de 0,2 mL de *Aeromonas* spp. preparado com solução salina estéril (0,85%) na concentração  $10^8$  UFC/mL, por via intramuscular laterodorsal direita foi realizada em 28 peixes de cada tratamento após o término do período de desempenho (45 dias). Os peixes continuaram recebendo as dietas experimentais, e foram monitorados quanto aos sinais clínicos e comportamentais de infecção por *Aeromonas* spp. e sobrevivência por um período de 14 dias.



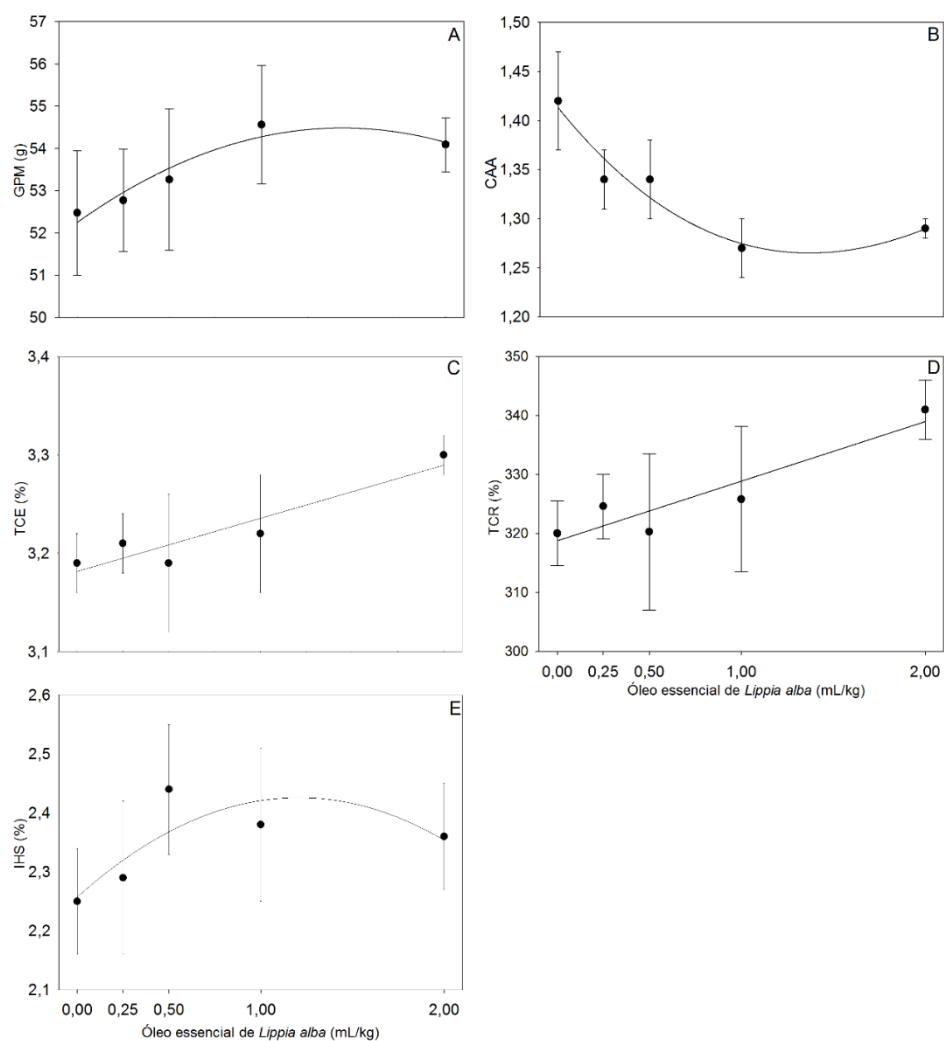
### **Análise estatística**

Todos os valores são representados por média  $\pm$  erro padrão. A homogeneidade das variâncias entre os grupos foi testada com o teste de Levene. As comparações entre diferentes grupos foram realizadas usando ANOVA one-way, seguida de análise de regressão. Diferenças foram consideradas significativas com  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

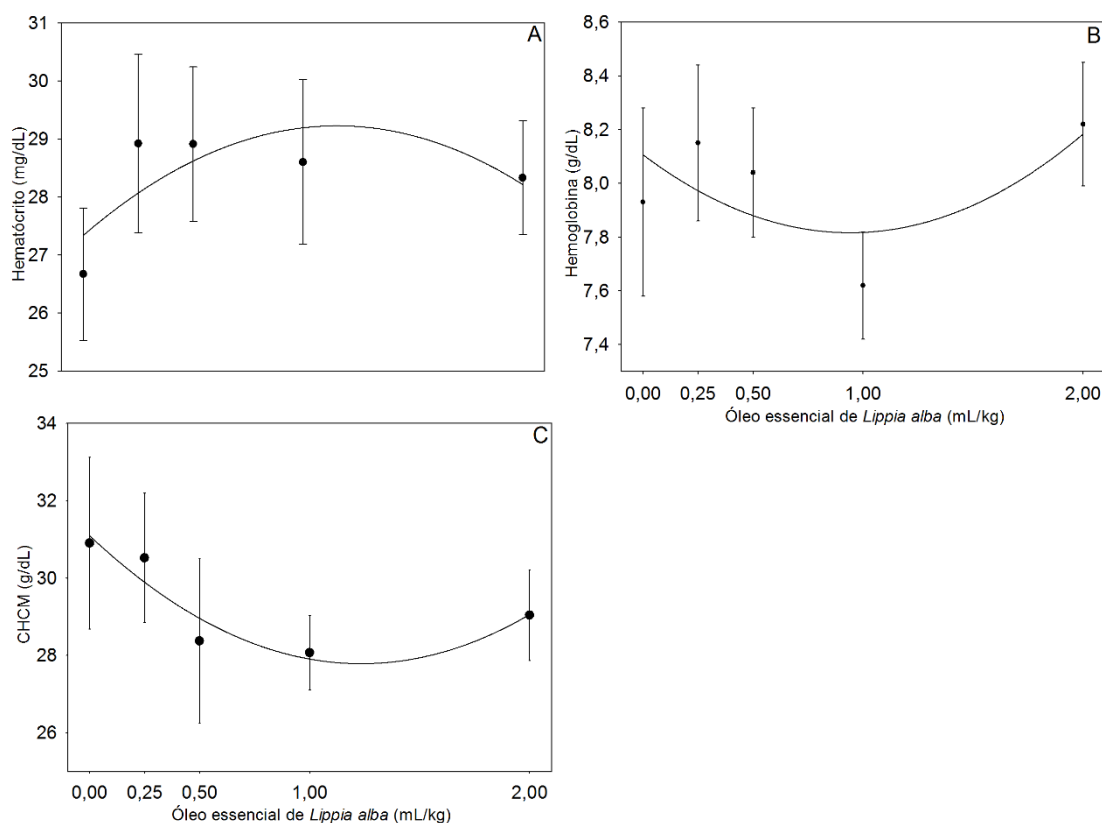
Não ocorreu mortalidade durante a avaliação de desempenho. O GPM apresentou os maiores valores nas maiores concentrações de OELA, e IHS a partir de 0,5 mL/kg (Fig. 1A e E), enquanto que os valores de CAA foi maior no tratamento controle e reduziu com o acréscimo dos níveis de OELA adicionados na dieta de juvenis de tilápia do Nilo (Fig. 1B). Os valores de TCE e TCR aumentaram proporcionalmente em função do aumento das concentrações de OELA na dieta de tilápia do Nilo (Figura 1C e D).

Figura 1 - Desempenho de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba* durante 45 dias (n = 12 por tratamento). GPM = Ganho de Peso Médio. CAA= Consumo Alimentar Aparente. TCE= Taxa de crescimento específico. TCR= Taxa de crescimento relativo. IHS= Índice hepatossomático. A:  $y = -1553,303 + (57,379x) - (0,529x^2)$ ;  $R^2 = 0,72$ . B:  $y = 0,105x^2 - 0,2677x + 1,411$ ;  $R^2 = 0,93$ . C:  $y = -51,783 + 16,304x$ ;  $R^2 = 0,88$ . D:  $y = -27,315 + 0,0860x$ ;  $R^2 = 0,87$ . E:  $y = -736,968 + (625,720x) - (132,568x^2)$ ;  $R^2 = 0,69$ .



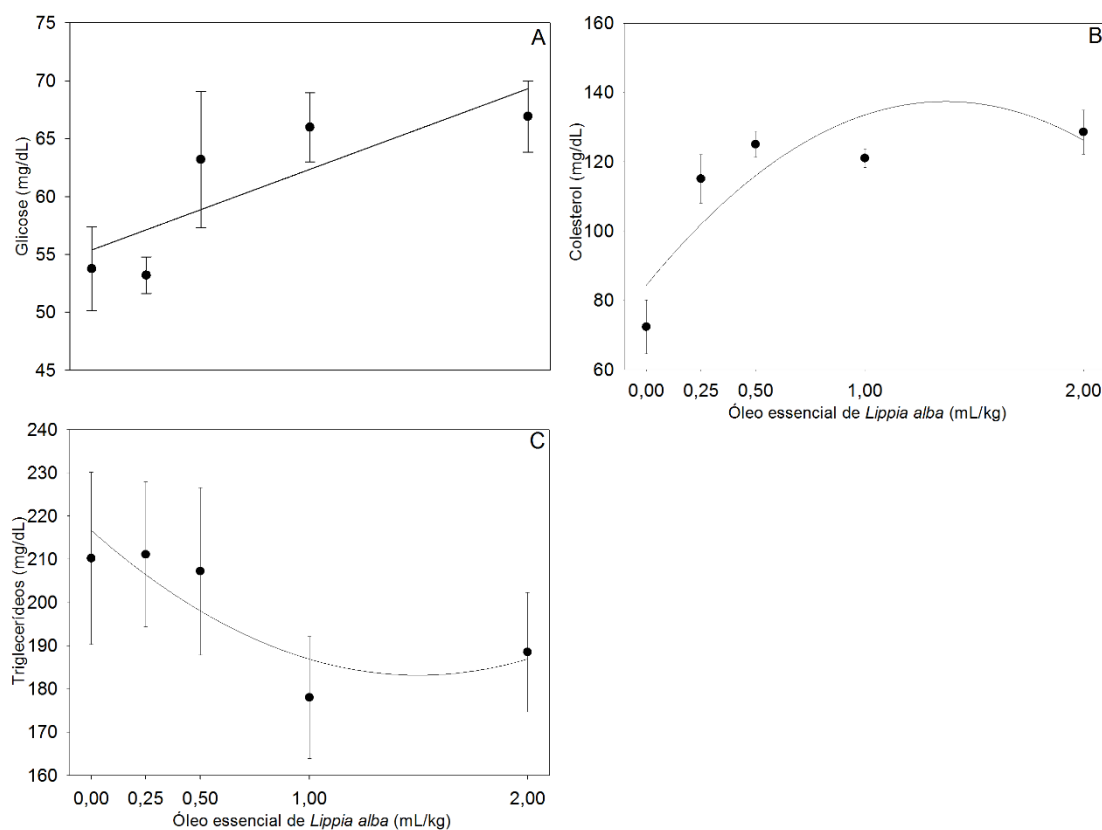
A adição de OELA na dieta de juvenis de tilápia do Nilo aumentou os valores de hematócrito em relação ao tratamento controle, embora o menor valor de hemoglobina tenha ocorrido no tratamento 1 mL/kg de OELA (Fig. 2A e B) e reduziu o valor de CHCM (Fig. 2C).

Figura 2 - Parâmetros hematológicos de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba* durante 45 dias (n = 12 por tratamento). CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média. A:  $y = -1269,104 + (91,348x) - (1,641x^2)$ ;  $R^2 = 0,95$ . B:  $y = 970,248 - (245,976x) + (15,588x^2)$   $R^2 = 0,71$ . C:  $y = -567,876 + (38,936x) - (0,666x^2)$ ;  $R^2 = 0,70$ .



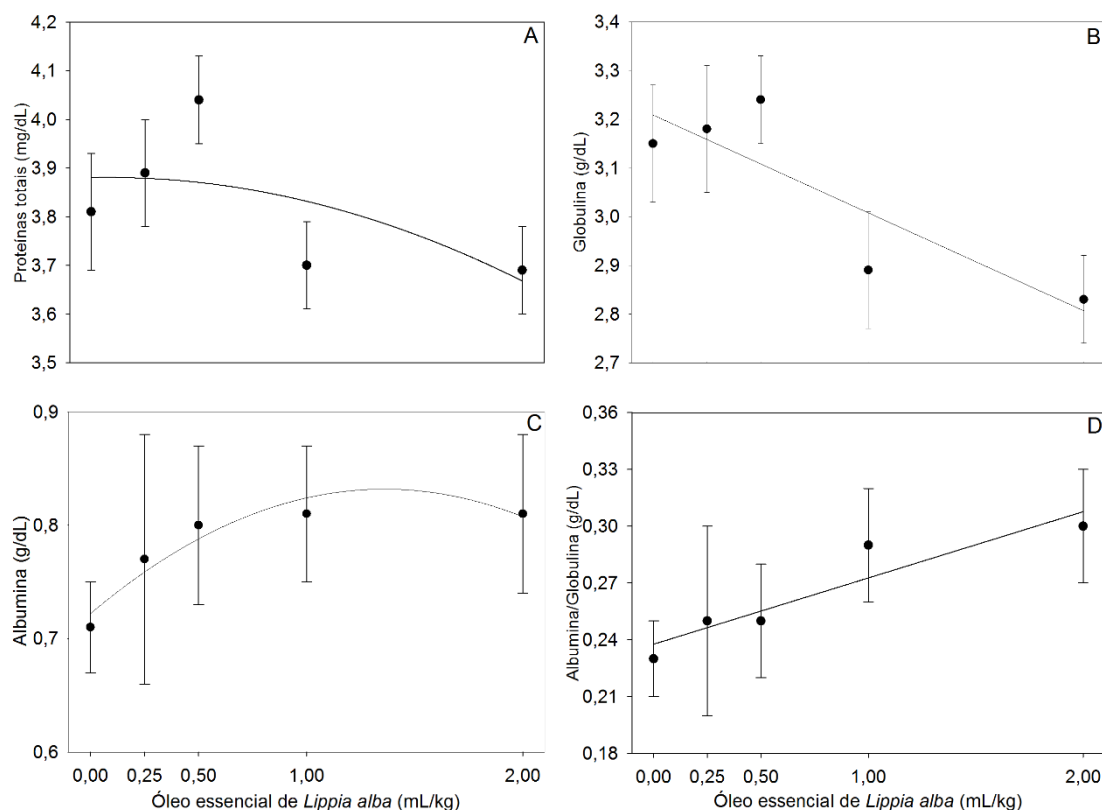
Glicose e colesterol plasmáticos aumentaram e triglicerídeo plasmático diminuiu com a adição de OELA na dieta de juvenis de tilápia do Nilo (Fig. 3 A, B e C).

Figura 3 - Parâmetros metabólicos plasmáticos de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba* durante 45 dias (n = 12 por tratamento). A:  $y = -5,215 + 0,0984x$ ;  $R^2 = 0,69$ . B:  $y = 14,741 - (0,335x) + (0,00181x^2)$ ;  $R^2 = 0,73$ . C:  $y = -181,491 + (1,918x) - (0,00501x^2)$ ;  $R^2 = 0,94$ .



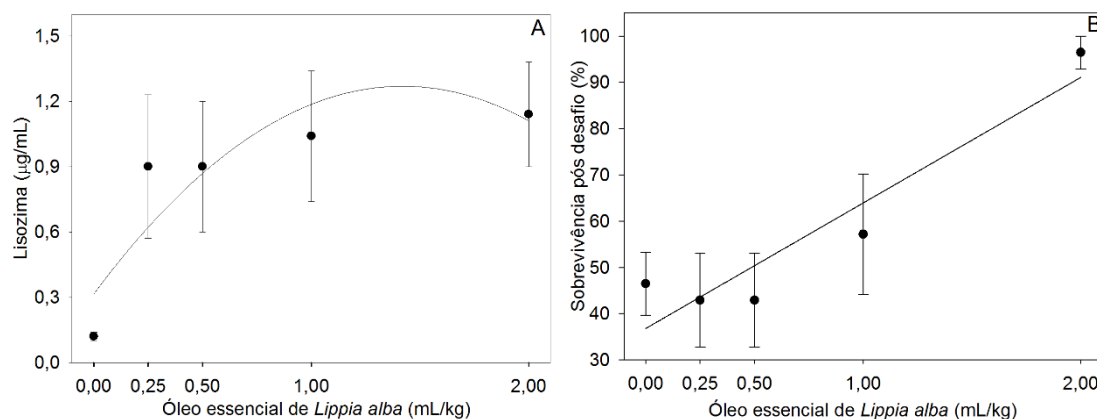
Observou-se redução dos valores de proteínas totais e globulina nos maiores níveis de OELA (Fig. 4A e B) e aumento dos valores de albumina plasmática e relação albumina/globulina (Fig. 4C e D).

Figura 4 - Parâmetros proteicos e enzimáticos plasmáticos de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba* durante 45 dias (n = 12 por tratamento). A:  $y = 523,516 - (268,070x) + (34,313x^2)$   $R^2 = 0,79$ . B:  $y = 11,993 - 3,676x$ ;  $R^2 = 0,74$ . C:  $y = 166,743 - (452,294x) + (306,303x^2)$ ;  $R^2 = 0,69$ . D:  $y = -5,813 + 24,858x$ ;  $R^2 = 0,87$ .



A lisozima plasmática e a sobrevivência pós desafio aumentaram com a adição de OEEL na dieta de juvenis de tilápia do Nilo (Fig. 5A e B). Após a inoculação com a bactéria *Aeromonas* spp., em todos os tratamentos, alguns peixes (~25%) apresentaram sinais clínicos tais como: exoftalmia, dermatite no corpo, principalmente no local da inoculação, ascite (abdômen distendido), hemorragias cutâneas na base das nadadeiras e no corpo, destruição total do pedúnculo caudal com exposição da musculatura, erosão das nadadeiras, apatia e apetite reduzido.

Figura 5 - Atividade de lisozima plasmática (n=12 por tratamento) e sobrevivência pós-desafio com *Aeromonas* spp. (n = 28 por tratamento) de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba* durante 45 dias. A:  $y = 0,603 - (5,726x) + (6,029x^2)$ ;  $R^2 = 0,97$ . B:  $y = -1,127 + (0,0328x)$   $R^2 = 0,80$



## DISCUSSÃO

Foram identificados no OELA 11 constituintes, onde linalool (81,64%) foi o componente mais abundante (Cap. 1). Saccol et al. (2013) avaliaram os constituintes do OELA cultivados na mesma região do presente trabalho e linalool também foi o componente mais abundante (55,26%). O linalool é um composto monoterpeneo que possui ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anestésica e sedativa (HELDWEIN et al., 2014), mas ainda sem relatos na promoção do crescimento em peixes.

O uso eficaz de óleos essenciais na promoção do crescimento e como imunestimulante em peixes tem sido relatado por estudos prévios (SACCOL et al., 2013; ACAR et al., 2015; ZEPPENFELD et al., 2015). Similarmente, neste estudo OELA adicionado a dieta demonstrou-se promissor para o aumento do desenvolvimento de juvenis de tilápia do Nilo.

Parâmetros zootécnicos são bastante utilizados para avaliação do desempenho do crescimento em peixes (BUYUKCAPAR et al., 2011; ALI et al., 2015), principalmente quando se trata de uma avaliação prévia da produtividade piscícola. Neste estudo, os maiores ganhos de desempenho foram obtidos nos peixes alimentados com 1,0 ou 2,0

mL/kg de OELA na dieta.

Similarmente ao presente estudo, Acar et al. (2015) e Zeppenfeld et al. (2015) relataram que dietas contendo óleo essencial de cascas de laranja (*Citrus sinensis*) (0,1%) e óleo essencial de *Aloysia triphylla* (2 mL/kg) aumentaram o ganho de peso em tilápia Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) e jundiá, respectivamente. Por outro lado, Saccol et al. (2013) em experimento com os mesmos níveis de OELA utilizados deste estudo em jundiás, não verificaram melhora no desempenho, mas recomendaram a adição de 0,5 mL/kg na dieta para elevar as reservas energéticas e aumentar a resposta antioxidante dos tecidos. Adicionalmente, Baba et al. (2016) não observaram diferenças no desempenho da tilápia Moçambique em dieta com níveis de inclusão de até 1% de óleo essencial de cascas de limão (*Citrus limon*).

Esta discrepância de resultados quanto ao desempenho entre os estudos relatados pode ser atribuída às diferenças quanto ao óleo essencial utilizado e/ou concentrações dos compostos bioativos que variam de acordo com o tecido vegetal usado para extração de óleo essencial, local de cultivo, época e horário de colheita, bem como método de processamento, extração e armazenamento (APPLEGATE et al., 2010, YANG et al., 2015). Além disso, as respostas encontradas também são influenciadas por: espécie, idade e fase de desenvolvimento do peixe (COSTA et al., 2013; YANG et al., 2015). Entretanto, ainda é necessário elucidar se os efeitos potenciais ocorrem pela ação dos componentes majoritários ou ao efeito sinérgico de seus vários constituintes (RAINER et al., 2015).

Além dos parâmetros zootécnicos, o estudo de variáveis hematológicas e bioquímicas fornecem informações relevantes das condições nutricionais, metabólicas, fisiológicas e de desenvolvimento de peixes (TAVARES-DIAS, 2015). No presente estudo, os valores dos parâmetros hematológicos observados estão de acordo com os preconizados por Tavares-Dias (2015) para a tilápia do Nilo em condições nutricional e ambiental adequadas. Entretanto, em peixes, tais parâmetros variam em função de sexo, fatores ambientais, idade, comportamento, tamanho, condição de higidez, fatores nutricionais, tempo de manuseio na coleta de sangue, dentre outros (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; THRALL et al., 2015).

Os eritrócitos têm como função transportar oxigênio e gás carbônico, através do seu componente principal, a hemoglobina (TAVARES-DIAS et al., 1999; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Baixas concentrações de hematócrito estão relacionados à

processos anêmicos (HIGUCHI et al., 2011), fato não verificado no presente estudo.

Neste estudo, as variáveis hematológicas foram melhoradas com a adição de OELA na dieta de juvenis de tilápia do Nilo, aumentando a capacidade de transporte de oxigênio e, conseqüentemente, melhorando a saúde e o crescimento dos peixes (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Ribeiro et al. (2016) também relataram aumento nos teores de hemoglobina em tambaquis (*Colossoma macropomum*) com 0,5 e 1,5% de óleo essencial de *Mentha piperita*. Por outro lado, Saccol et al. (2013) utilizaram as mesmas concentrações de OELA deste estudo para a dieta de jundiás e não observaram nenhuma alteração para hematócrito, hemoglobina e CHCM. Possivelmente, as diferenças nos resultados de parâmetros hematológicos entre o presente estudo e aquele realizado por Saccol et al. (2013) possam ter ocorrido em função da espécie e comportamento alimentar, uma vez que exemplares de tilápia do Nilo são mais ativos e com alta conversão alimentar.

A síntese de glicose depende da produção hepática resultante da gliconeogênese e da glicogenólise a fim de manter os níveis circulantes no sangue (TRHALL et al., 2015). As concentrações de glicose plasmática verificadas no presente estudo estiveram dentro dos valores observados para a tilápia do Nilo (14,1 – 92,1 mg/dL) (TAVARES-DIAS, 2015). Diferentemente dos achados deste estudo, não ocorreu aumento nos níveis de glicose plasmática em jundiás alimentados com dietas com níveis de até 0,50 (SOUZA et al., 2015) ou 2,0 mL/kg de OELA (SACCOL et al., 2013).

Toni et al. (2016) observaram aumento nas atividades de enzimas ligadas ao metabolismo energético, proteico, e lipídico em jundiás submetidos a exposição do óleo essencial de *Hesperozygis ringens*, o que levou tais autores a inferir na utilização da via da gliconeogênese para a manutenção da homeostase.

O aumento do colesterol plasmático observado nos juvenis de tilápia do Nilo que foram alimentados com dietas com 1,0 ou 2,0 mL/kg do OELA não foi o esperado. O linalool, constituinte majoritário do OELA possui efeito hipocolesterolêmico (CHO et al., 2011). A administração oral de linalool em ratos (por 6 semanas) causou redução das concentrações do colesterol, devido a interferência na síntese da enzima HMG-CoA redutase, enzima chave na regulação da síntese de colesterol (CHO et al., 2011). Lillehoj et al. (2011) observaram que compostos derivados de óleos essenciais (Ex. carvacrol) ativam vias do metabolismo lipídico, entretanto, ainda há pouca compreensão de como



estas vias são influenciadas e como afetam o desenvolvimento dos peixes.

Proteínas totais são indicativos do sistema de defesa (EL-DAKAR et al., 2015), além de estarem relacionadas com o metabolismo proteico e refletirem o estado nutricional dos peixes (HIGUCHI et al., 2011). A diminuição das proteínas plasmáticas totais também são decorrentes da redução dos teores de albumina e/ou globulina. No caso do presente estudo, o nível de globulina foi diminuído o que pode ter propiciado a diminuição dos níveis de proteínas totais (THRALL et al., 2015).

As globulinas são classificadas como alfa, beta e gama globulinas e têm como função o transporte de substâncias como metais e lipídios, além de possuir papel imunitário. Sua importância no metabolismo proteico é limitada, sendo indicativas de processos inflamatórios quando em níveis altos (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). Correlação negativa entre globulina e albumina pode ocorrer, em que o aumento da globulina inibe a síntese de albumina no fígado. E o aumento da globulina em relação a albumina pode significar disfunção hepática (GONZÁLEZ, 1997), fato não ocorrido no presente trabalho. A relação albumina/globulina aumentou nos peixes submetidos a dietas com as maiores concentrações de OELA, o que indica ausência de efeito imunossupressor (KUMAR et al., 2005).

A avaliação imunológica constitui-se como um parâmetro eficaz de avaliação da higidez dos peixes. Segundo Waagbø (1994), aspectos de saúde como imunologia e resistência a doenças devem ser utilizados como critérios para recomendações ótimas de nutrientes. Os imunostimulantes permitem impulsionar os mecanismos de defesa para proteção dos animais contra doenças infecciosas, aumentando a resposta imune inata (SAKAI, 1999), como da lisozima plasmática. Esta enzima é produzida por células epiteliais e leucócitos e atua clivando ligações específicas presentes nos peptídeoglicanos da parede celular bacteriana, resultando na lise celular (GARCIA et al., 2005).

As bactérias Gram-positivas parecem ser mais sensíveis a ação da lisozima devido ao melhor acesso à camada de peptídeoglicano, expondo a membrana celular (MURPHY et al., 2014). Dessa forma, os resultados deste estudo demonstraram que OELA possui potencial para ativar o sistema imunológico da tilápia do Nilo, como verificado pelo aumento da atividade da lisozima plasmática, inclusive nas menores concentrações de OELA na dieta.

Em estudos que envolvam imunonutrição, é importante a utilização em desafio

com patógenos e sua administração por injeção, banho ou coabitação, a qual pode trazer informações mais contundentes sobre o papel nutritivo da dieta, uma vez que as reações imuno-fisiológicas sofrem influências direta da mesma ou indiretamente pelas alterações metabólicas (WAAGBØ, 1994). Os óleos essenciais são compostos que contém uma heterogeneidade de substâncias bioativas com papel antimicrobiano e têm recebido atenção especial como alternativas naturais para substituir antibióticos promotores de crescimento em peixes (BENTO et al., 2013).

Neste estudo, o desafio com *Aeromonas* spp. demonstrou que as maiores taxas de sobrevivência ocorreram nos tratamentos em que os peixes foram submetidos a dietas com as maiores adições de OELA. Tal resultado se relaciona ao potencial antimicrobiano de OELA que causa alterações na permeabilidade da membrana celular bacteriana (MAJOLO et al., 2016) e/ou aumento da atividade da lisozima, a qual também hidrolisa e danifica as paredes celulares bacterianas (GARCIA et al., 2005) e apresenta papel importante no mecanismo de defesa em peixes, tornando-os mais resistentes às infecções.

Similarmente, o aumento da resistência à infecção contra *A. hydrophila* foi demonstrada em jundiás com o uso de *A. triphylla* (2,0 mL/kg) (SANTOS et al., 2017) e por Zheng et al. (2009) com o óleo essencial de orégano (*O. heracleoticum*) em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) inoculados com *A. hydrophila*. De forma geral, níveis de inclusão de 1,0 e 2,0 mL/kg de OELA na dieta de juvenis de tilápia do Nilo contribuíram para a melhora na função imune e sobrevivência a infecção com *Aeromonas* spp.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação de concentrações de 1,0 a 2,0 mL/kg de OELA na dieta é benéfico ao desenvolvimento de juvenis de tilápia do Nilo, pois apresentaram papel imunoestimulante, não provocaram alterações metabólicas e promoveram aumento de crescimento, além de contribuir para o aumento da sobrevivência em exemplares de tilápia do Nilo infectados com *Aeromonas* spp.

## AGRADECIMENTOS

A Codevasf, Petrolina-PE, pela doação dos peixes e pelo fornecimento de estrutura para

realização do experimento em parceria com a Embrapa Semiárido. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto e a Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa concedida a RCS.

## REFERÊNCIAS

ABREU, J.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; URBACZEK, A.C.; FONSECA, L. M.; URBINATI, E.C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 1133-1139, 2009.

ACAR, Ü.; KESBIÇ, O.S.; YILMAZ, S.; GÜLTEPE, N.; TÜRKER, A. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, v. 437, p. 282-286, 2015.

ALI, A. E; MEKHAMAR, M.I; GADEL-RAB, A.G.; OSMAN A.G. M. Evaluation of growth performance of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* fed *Piophil casei* Maggot Meal (Magma meal) diets. **American Journal of Life Sciences**, v. 3, p. 24-29, 2015.

APPLEGATE, T.J.; KLOSE, V.; STEINER, T.; GANNER, A.; SCHATZMAYR, G. Probiotics and phytogenics for poultry: Myth or reality? **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, p. 194-210, 2010.

ASSEM, S.; L-ZAEEM S.; SAMY, Y. Application of biotechnology in fish breeding. II: production of highly immune genetically modified red belly tilapia, *Tilapia zillii*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 449-459, 2005.

AZAMBUJA, C.R.; MATTIAZZI, J.; RIFFEL, A.P.K.; FINAMOR, I.A.; GARCIA, L.O.; HELDWEIN, C.G.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M.A.; LLESUY, S.F. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on

oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, v. 319, p. 156-161, 2011.

BABA, E.; ACAR, Ü.; ÖNTAŞ, C.; KESBİÇ, O.S.; YILMAZ, S. Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture**, v. 465, p. 13-18, 2016.

BENTO, M.H.L.; OUWEHAND, A.C.; TIIHONEN, K.; LAHTINEN, S.; NURMINEN, P.; SAARINEN, M.T.; SCHULZE, H.; MYGIND, T.; FISCHER, J. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals—Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, p. 449-458, 2013.

BOON, J.H.; CANNAETS, V.M.H.; AUGUSTIJN, H.; MACHIELS, M.A.M.; CHARLEROY, D.; OLLEVIER, F. The effect of different infection levels with infective larvae of *Anguillicola crassus* on haematological parameters of European Eel (*Anguila anguila*). **Aquaculture**, v. 87, p. 243-253, 1990.

BUYUKCAPAR, H.M; ATALAY, A.I.; KAMALAK, A. Growth performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with diets containing different levels of hydrolysable and condensed tannin. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 13, p. 1045-1051, 2011.

CHO, S.-Y.; JUN, H.; LEE, J.H.; JIA, Y.; KIM, K.H.; LEE, S.-J. Linalool reduces the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase via sterol regulatory element binding protein-2- and ubiquitin-dependent mechanisms. **FEBS Letters**, v. 585, p. 3289-3296, 2011.

COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, p. 550-552, 1944.

COSTA, L.B.; LUCIANO, F.B.; MIYADA, V.S.; GOIS, F.D. Herbal extracts and organic acids as natural feed additives in pig diets. **South African Journal of Animal Science**, v.43, 181-193, 2013.

EL-DAKAR, A.Y.; SHALABY, S.M.; NEMETALLAH, B.R.; SALEH, N.E.; SAKR, E.M.; TOUTOU, M.M. Possibility of using basil (*Ocimum basilicum*) supplementation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diet. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, p. 203-210, 2015.

ELLIS, A.E. **Lysozyme Assays**. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERSON, B.S.; VAN MUISWINKEL, W.B., Eds., Techniques in fish immunology fair haven, SOS Publications, Fair Haven, 101-103, 1990.

EL-SAYED, A.F.M. **Tilapia Culture**. London: Cabi. 2006. 277p.

FAO. 2016. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.

FERREIRA, P. M.F.; BARBOSA, J.M.; SANTOS, E.L.; SOUZA, R.N.; SOUZA, S.R. Avaliação do consumo de oxigênio da tilápia do Nilo submetidas a diferentes estressores. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 6, p. 56-62, 2011.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.

GARCIA, M.; CHATE, S.C.; PORTO, A.C.R.; FIGUEIRA, Y.F.; DIEGUEZ, A.D.; FERES, F.C.; MARTINS, M. de F. M. Dosagem de lisozima para avaliação da resposta imune em bezerros. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, p. 66-71, 2005.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.

GONZÁLEZ, F.D.H. O perfil metabólico no estudo de doenças da produção em vaca leiteiras. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v, 25, p. 13-33, 1997.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2ª Ed. Porto Alegre, Editora UFRGS, 2006.

HELDWEIN, C.G.; SILVA, L.L.; GAI, E.Z.; ROMAN, C.; PARODI, T.V.; BÜRGER M.E.; BALDISSEROTO, B.; FLORES, E.M.M.; HEINZMANN, B.M. S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 41, p.621-629, 2014.

HIGUCHI, L.H.; FEIDEN, A.; MALUF, M.L.F.; DALLAGNOL, J.M.; ZAMINHAN, M.; BOSCOLO, W.R. Avaliação eritrocitária e bioquímica de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos à dieta com diferentes níveis proteicos e energéticos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, p. 70-75, 2011.

HOHLENWERGER, J.C.; EDUARDO COPATTI, C.; CEDRAZ SENA, A.; DAVID COUTO, R.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D. Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)? **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 49, p. 119-126, 2016.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J.K.A.; SILVA, D.B.; GRACINDO, L.A.M.; VIEIRA, R.F. Avaliação agrônômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p. 258-264, 2011.

KUMAR, S.; SAHU, N.; PAL, A.; CHOUDHURY, D.; YENGGOKPAM, S.; MUKHERJEE, S. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, p. 331-344, 2005.

LILLEHOJ, H.S.; KIM, D.K.; BRAVO, D.M.; LEE, S.H. Effects of dietary plant-derived phytonutrients on the genome-wide profiles and coccidiosis resistance in the broiler chickens. **BMC proceedings**, v.5, p. S4-S34, 2011.

MACHADO, T.F.; PEREIRA, R. de C.A.; BATISTA, V.C.V. Seasonal variability of the antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia alba*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 515-519, 2014.

MAJOLO, C.; DA ROCHA, S.I.B.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; BIZZO, H. R. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/are.13073>>. Acesso em: 24 jan. 2017.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Immunobiology de Janeway**. 8. ed.: Artmed, 2014.

OBACH, A.; QUENTEL, C.; LAURENCIN, F.B. Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 15, p. 175–185, 1993.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3. ed. Maringá: Eduem. 2008. 311p.

RAINER, A. Secondary plant compounds are more than essential oils. **Lohmann Information** v, 49. p. 12-17, 2015.

RIBEIRO, S.C.; CASTELO, A.S.; SILVA, B.M.P. da; CUNHA, A. da S.; PROIETTI JÚNIOR, A.A.; OBA-YOSHIOKA, E.T. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Acta Amazônica**, v. 46, n. 1, p. 99-106, 2016.

SACCOL, E.M.H.; UCZAY, J.; PÊS, T.S.; FINAMOR, I.A.; OURIQUE, G.M.; RIFFEL, A.P.K.; SCHMIDT, D.; CARON, B.O.; HEINZMANN, B.M.; LLESUY, S.F.; LAZZARI, R.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M.A. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416-417, p. 244-254, 2013.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92, 1999.

SANTOS, A.C.; SUTILI, F.J.; HEINZMANN, B.M.; CUNHA, M.A.; BRUSQUE, I. C. M.; BALDISSEROTTO, B.; ZEPPENFELD, C.C. *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: Blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 62, p. 213-216, 2017.

SOUZA, C. de F.; SALBEGO, J.; GRESSLER, L.T.; GOLOMBIESKI, J.I.; FERST, J. G.; CUNHA, M.A.; HEINZMANN, B.M.; CARON, B.O.; GLANZNER, W.G.; GONÇALVES, P.B.D.; BALDISSEROTTO, B. *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard 1824), submitted to a stressful condition: effect of dietary addition of the essential oil of *Lippia alba* on metabolism, osmoregulation and endocrinology. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, p. 707-714, 2015.

SRINIVASAN, K. Spices as Influencers of Body Metabolism: An Overview of Three Decades of Research. **Food Research International**, v. 38, n. 1, p. 77-86, 2005.

STARLIPER, C.E.; KETOLA, H.G.; NOYES, A.D.; SCHILL, W.B.; HENSON, F.G.; CHALUPNICKI, M.A.; DITTMAN, D.E. An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 89-97, 2015.

SUTILI, F.J.; SLIMA SILVA, L.; GRESSLER, L.T.; BATTISTI, E.K.; HEINZMANN, B.M. VARGAS, A.C.; BALDISSEROTO, B. Plant essential oils against *Aeromonas*



*hydrophila*: *in vitro* activity and their use in experimentally infected fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p. 47-54, 2015.

TAVARES, I.B.; MOMENTÉ, V.G.; NASCIMENTO, I.R. do. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, p. 204-220, 2011.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R.A.; GIOLI, L.D.; FAUSTINO, C.D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, p. 423-431, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004. 144 p.

TAVARES-DIAS. **Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados**. In: Tavares-Dias, M. & Mariano, W.S. (Org.). *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos, Editora Pedro & João, 2015.

THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca, 2015, 678 p. 2015.

TONI, C.; MARTOS-SITCHA, J. A.; RUIZ-JARABO, I.; MANCERA, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; PINHEIRO, C. G.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Stress response in silver catfish (*Rhamdia quelen*) Exposed to the essential oil of *Hesperozygis ringens*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 129-138, 2015.

VASEEHARAN, B.; THAYA, R. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: An alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 22, p. 1079-1091, 2014.

WAAGBØ, R. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 25, p. 175-197, 1994.

WINDISCH, W; SCHEDULE, K; PLITZNER, C.; KROISMAYR, A. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 140-148, 2008.

YAKUBU, A.F.; NWOGU, N. A.; APOCHI, J.O.; OLAJI, E.D.; ADAMS, T.E. Economic Profitability of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1757) in Semi Flow through Culture System. **Journal of Aquatic Science**, v. 2, p. 1-4, 2014.

YAMAMOTO, P.Y.; COLOMBO, C.A.; AZEVEDO FILHO, J.A.; LOURENÇÃO, A. L.; MARQUES, M.O. M.; MORAIS, G.D.S.; CHIORATO, A.F.; MARTINS, A.L.M.; SIQUEIRA, W. J. Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 481-489, 2008.

YANG, C; CHOWDHURY, M.A.K; HOU, Y.; GONG, J. Phytogenic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: Potentials and challenges in application. **Pathogens**, v. 4, p. 137-156, 2015.

ZENGIN, H.; BAYSAL, A. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM Microscopy. **Molecules**, v. 19, p. 17773-17798, 2014.

ZEPPENFELD, C.C; HERNANDEZ, D. R; SANTINON, J.J; HEINZMANN, B. M; DA CUNHA, M.A; SCHMIDT, D.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 933-940, 2015.

ZHENG, Z. L.; TAN, J.Y.; LIU, H.Y.; ZHOU, X.H.; XIANG, X.; WANG, K.Y. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant

effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, p. 214-218, 2009.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

O OEAT e OELA apresentaram potencial antimicrobiano contra bactérias patogênicas de peixes *Aeromonas* spp. Exibiram atividade em interferir na formação do biofilme, entretanto, quando já consolidado, os dois óleos essenciais não foram capazes de interferir. Quando combinados com o antibiótico florfenicol proporcionaram um potencial sinérgico, o que causou uma redução na dose mínima deste antimicrobiano (comumente utilizado em pisciculturas). Deste modo, OEAT e OELA são potenciais adjuvantes e representam uma perspectiva no combate a resistência bacteriana.

A adição de 2 mL/kg de OEAT na dieta de juvenis de tilápia do Nilo resultou em maior ganho de peso, apresentando-se como promissor promotor de crescimento e imunoestimulante. Proporcionou aumento na atividade das enzimas lipase e protease alcalina. Também aumentou o valor de hematócrito, número de hemácias, proteína total do plasma. Observou-se redução nas concentrações de hemoglobina. A lisozima plasmática aumentou, o que significa um papel imunoestimulante, embora não tenha influenciado na sobrevivência em situação de desafio com *Aeromonas* spp.

Quanto ao OELA, a suplementação entre 1,0 a 2,0 mL/kg de OELA na dieta trouxe benefícios ao desempenho de juvenis de tilápia do Nilo. Apresentaram papel imunoestimulante, sem alterações consideráveis no metabolismo. Quando foram desafiados com a bactéria *Aeromonas* spp. observou-se o aumento da sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo.

Diante do grave problema de saúde mundial que é a resistência bacteriana, destaca-se a importância de terapias combinadas entre os antibióticos convencionais e óleos essenciais, destacando-se além do potencial de OEAT e OELA como agentes atenuadores da resistência bacteriana, promotores de crescimento e imunoestimulantes.

Destaca-se ainda além dos citados acima, o grande potencial da *Lippia alba*, espécie amplamente difundida na América do Sul, e em outros países. Por ser uma planta de propagação rápida, o que contribui para a obtenção de óleo essencial, uma vez que produtos naturais são tidos como seguros, o que estimula a produção em larga escala para utilização principalmente na cadeia da piscicultura.

**ANEXOS**

Figura 1. Sinais clínicos observados em juvenis de tilápia do Nilo infectados experimentalmente com *Aeromonas* spp. A: exoftalmia; B: dermatite no corpo, principalmente no local da inoculação; C: ascite (abdômen distendido); D: hemorragias cutâneas na base das nadadeiras e no corpo; E: destruição total do pedúnculo caudal com exposição da musculatura; F: úlcera expondo tecidos mais profundos; G: erosão das nadadeiras. Fonte: Arquivo pessoal, (2016).

