

Jorge Pedro Rodrigues Soares

Suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia alba* sobre os parâmetros hemato-imunológicos de tilápia do Nilo

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

Orientador: Dr. Maurício Laterça Martins
Coorientador: Dr. Adolfo Jatobá Medeiros Bezerra

Florianópolis
2015

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

Rodrigues-Soares, Jorge Pedro

Suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia alba* sobre os parâmetros hemato-imunológicos de tilápia do Nilo / Jorge Pedro Rodrigues-Soares ; orientador, Maurício Laterça Martins ; coorientador, Adolfo Jatobá. - Florianópolis, SC, 2015.

63 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. *Oreochromis niloticus*. 3. fitoterápicos. 4. hematologia. 5. inflamação. I. Martins, Maurício Laterça. II. Jatobá, Adolfo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia alba* sobre os parâmetros hemato-imunológicos de tilápia do Nilo

Por

JORGE PEDRO RODRIGUES SOARES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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



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

Banca Examinadora:



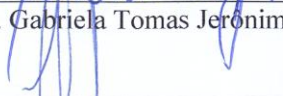
Dr. Felipe do Nascimento Vieira – *Presidente*



Dr. Evoy Zaniboni Filho



Dra. Gabriela Tomas Jerônimo



Dr. José Luiz Pedreira Moura

*Aos meus pais José Alexandre Rodrigues
Soares e Ivone Maria Posse*

*Pelo amor, carinho, cuidados, dedicação, pela
ádua batalha que vocês enfrentaram para que
eu realizasse esse sonho.*

*Aos meus irmãos Maria Cristina Posse e José
Alexandre Rodrigues Soares Filho*

*Pela amizade, pelo amor, pela força que me
deram para que eu chegasse até aqui.*

*Aos meus sobrinhos(as) Mariana, Mateus,
Maria Eduarda e Ariel*

*Pela paz, sorrisos e carinhos que só vocês me
proporcionam...*

*In memoriam de Napoleão Rodrigues Soares
(tio) e Gezuína Ferreira Dona (avó)*

*Por terem feito parte da minha vida.
Saudades Eternas!*

Com amor dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Maurício Laterça Martins, pela orientação acadêmica, profissional e pessoal, pela paciência, pela amizade, por confiar em mim, por propiciar essa oportunidade, e, claro, pelos ensinamentos que levarei sempre comigo. Muito obrigado.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Adolfo Jatobá, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório. Por ter sido peça fundamental na execução desse trabalho. Pelos seus conselhos, puxões de orelha e por sua amizade, muito obrigado.

Ao Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño, pela atenção, pelas conversas, conselhos, ensinamentos compartilhados e pela amizade, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos do Laboratório AQUOS, Dudu, Gabriel, Gustavo, Hugo, Marco, Lucas, Zezinho, Paula, Pati, Carol, Aline, Maitê, Gabi Jerônimo, Natália Marchiori, Scheila, Douglas, Marcela, Karen, Lilian, Maria Luiza, Mony e Gabi Hashimoto. Obrigado pelos ensinamentos que contribuíram para meu enriquecimento profissional e pessoal, pelas conversas, cafés e confraternizações que sempre renderam boas risadas.

Agradeço também, ao amigo Jacó Mattos (LABCAD), pela paciência e colaboração na realização das análises.

Aos amigos do Laboratório de Aquicultura do Instituto Federal Catarinense – Araquari. Obrigado pela ajuda inestimável na execução do trabalho. E um agradecimento especial ao grande Mestre Moreira, pelas conversas, pelos cafés e por dividir comigo todo seu conhecimento.

Aos companheiros de república, que sempre se fizeram presentes, nos momentos de dificuldades e de alegrias, Zé Bereta, Alessandro, Vanessa, Tauan, Lentz, Claudinha, Paulo, Klayton, Cunixa, Fernanda, Karol e Larissa. Obrigado pelos momentos e histórias compartilhadas.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, pelo apoio institucional e pelo ensino de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Dra. Edsandra Campos Chagas da EMBRAPA-Amazônia Ocidental, por ceder os óleos essenciais utilizados no trabalho.

Ao Instituto Federal Catarinense-Araquari, por ceder o espaço físico para realização do experimento.

A todos que de alguma forma participaram da realização desse sonho deixo, aqui registrado, os meus sinceros agradecimentos.

“Obrigado a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês. ”

Augusto Branco

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito da suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia alba* sobre os parâmetros hemato-imunológicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas ao quadro de inflamação aguda induzida por injeção de carragenina na bexiga natatória. Pelo período de 45 dias, 96 peixes foram divididos em quatro tratamentos em triplicata, sendo eles: peixes suplementados com óleo essencial de *L. alba* (4 mL.kg⁻¹ de ração) injetados com carragenina; peixes suplementados com álcool de cereais injetados com carragenina; peixes não suplementados com óleo essencial injetados com carragenina; peixes não suplementados e não injetados. Seis horas após o estímulo inflamatório, foram analisados os níveis de cortisol sérico, eritrograma, leucograma e infiltrado inflamatório. Peixes injetados com carragenina apresentaram o quadro de inflamação aguda, caracterizado pela maior infiltração de neutrófilos e monócitos. O número de neutrófilos circulantes foi maior nos animais suplementados com *L. alba* quando comparado aos demais tratamentos (p = 0,004). Não houve diferença nos níveis de cortisol sérico. A suplementação com óleo essencial de *L. alba*, para a dose, tempo e forma de administração testadas, não apresentou atividade anti-inflamatória. Por outro lado, observou-se influência da suplementação dietária sobre o número total de neutrófilos após o quadro de aerocistite, destacando sua característica imunomoduladora.

Palavras-chave: Aquicultura, *Oreochromis niloticus*, fitoterápicos, hematologia, inflamação.

ABSTRACT

The present study evaluate the dietary supplementation with essential oil of *Lippia alba* on the hemato-immunological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) submitted to acute inflammation induced by carrageenin injection in the swim bladder. For a period of 45 days, 96 fish were divided in four treatments in triplicate, as follows: fish supplemented with essential oil of *L. alba* (4 mL.kg⁻¹ dry ration) injected with carrageenin; fish supplemented with cereal alcohol injected with carrageenin; fish non-supplemented with essential oil injected with carrageenin; fish non-supplemented and non-injected. Cortisol levels, erythrogram, leukogram and the inflammatory infiltrate were analyzed six hours after inflammatory stimulus. Fish injected with carrageenin showed acute inflammatory reaction characterized by higher infiltrate of neutrophils and monocytes. The circulating neutrophils number was higher in fish supplemented with *L. alba* when compared to other treatments ($p = 0.004$). No difference in cortisol levels was found. For dose, time and administration form tested, the supplementation with essential oil of *L. alba* did not present anti-inflammatory activity. On the other hand, it was observed influence of dietary supplementation on the neutrophils number after induced aerocystitis highlighting its immunomodulation characteristic.

Keywords: Aquaculture, *Oreochromis niloticus*, phytotherapies, hematology, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Valores médios \pm desvio padrão do cortisol sérico de tilápia do Nilo suplementada com óleo essencial de *Lippia alba*, álcool de cereais e não suplementadas, após indução de aerocistite por injeção de carragenina, e grupo não suplementado não injetado (ração). 40

Figura 2. Valores médios e desvio padrão da contagem total e diferencial de leucócitos do infiltrado inflamatório de tilápia do Nilo suplementada com *Lippia alba*, álcool de cereais ou não suplementadas, após indução de aerocistite por injeção de carragenina, e grupo não suplementado não injetado (ração)..... 44

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1: Constituintes químicos do óleo essencial de *Lippia alba* N.E.Br. 38
- Tabela 2: Valores médios \pm desvio padrão do eritrograma de tilápia do Nilo suplementadas com óleo essencial de *Lippia alba*, álcool de cereais e não suplementadas, após indução de aerocistite por injeção de carragenina, e grupo não suplementado não injetado (ração). 41
- Tabela 3: Valores médios \pm desvio padrão do leucograma de tilápia do Nilo suplementadas com óleo essencial de *Lippia alba*, álcool de cereais e não suplementadas, após indução de aerocistite por injeção de carragenina, e grupo não suplementado não injetado (ração). 42

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	21
Produção aquícola.....	21
Inflamação.....	22
Fitoterápicos.....	24
Óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	26
JUSTIFICATIVA	28
OBJETIVOS	29
CAPÍTULO 1	31
Suplementação dietária com óleo essencial de <i>Lippia alba</i> sobre os parâmetros hemato-imunológicos de tilápia do Nilo.....	31
1.Introdução	34
2.Material e Métodos	36
2.1.Desenho Experimental.....	36
2.2.Aclimatação.....	37
2.3.Alimentação.....	37
2.4.Composição do óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	37
2.5.Inflamação.....	39
2.6.Análises hematológicas.....	39
2.7.Análises estatísticas.....	39
3.Resultados	40
3.1.Cortisol.....	40
3.2.Hematologia.....	40
3.3.Infiltrado Inflamatório.....	43
4.Discussão	44
4.1.Cortisol.....	44
4.2.Hematologia.....	45
4.3.Infiltrado Inflamatório.....	47
Conclusão	49
Agradecimentos	49
Referências	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	56

INTRODUÇÃO GERAL

Produção aquícola

Concomitante ao crescimento do setor produtivo, cresce também a necessidade do correto manejo dos sistemas de cultivos, seja do ambiente aquático ou cuidados inerentes à sanidade animal. Fatores que vão desde o manejo zootécnico como densidades de estocagem; manejo alimentar; monitoramento dos parâmetros de qualidade da água, até problemas estruturais como o sistema de drenagem dos tanques que influenciam na proliferação de patógenos no ambiente (MARTINS, 2004a). Além disso, problemas no cultivo acarretam em estresse fisiológico nos animais cultivados, quebrando o equilíbrio da tríade hospedeiro-patógeno-ambiente, aumentando a susceptibilidade de hospedeiros à agentes etiológicos como a ocorrência de patógenos oportunistas, naturalmente presentes no animal e no ambiente de cultivo (PAVANELLI et al., 2013; MARTINS, 2004a; LIZAMA et al., 2007).

A capacidade de se livrar de corpos estranhos, microrganismos e tecidos danificados é essencial para a sobrevivência do organismo. A inflamação caracteriza-se como um processo protetor do organismo para tais situações, seja quanto a sinalização e eliminação da causa como bactérias, toxinas, ou do resultado (ex. tecidos necrosados) dessas injúrias. A inflamação é uma reação complexa do organismo em resposta à injúrias provenientes das mais variadas causas, tendo como resultado alterações químicas e morfológicas, especialmente dos vasos sanguíneos e das células imunocompetentes, presentes na circulação (KUMAR et al., 2010).

Segundo Martins et al. (2001), o estudo da inflamação e de possíveis estratégias para seu controle é de importância para produção aquícola, uma vez que tais estudos podem ser utilizados como suporte científico ao manejo de animais cultivados, já que estão em constante contato com agentes e substâncias que podem provocar um quadro inflamatório.

Adicionalmente, a análise dos parâmetros sanguíneos é de extrema importância, tendo em vista que podem ser usados como indicadores biológicos auxiliando no monitoramento do estado sanitário dos peixes e do ambiente, sendo também ferramenta rápida na identificação do estresse causado aos peixes, seja pelo ambiente e/ou pelos patógenos. Tais informações podem servir como auxílio na avaliação do estado fisiológico dos peixes e na padronização das

condições ideais para seu cultivo (TAVARES-DIAS et al., 2009). Entretanto, também deve-se considerar que as condições de manejo de cada fazenda de peixes exercem interferência nas variáveis estudadas (JERÔNIMO et al., 2011).

Inflamação

A caracterização do quadro de inflamação aguda em peixes é dificultosa, uma vez que a cinética celular relatada é vasta e fatores como espécie, agentes flogógenos e alimentação podem afetar diretamente o conteúdo celular do infiltrado inflamatório (BOZZO et al., 2007).

Em mamíferos o processo inflamatório recebe duas diferentes classificações que variam de acordo com a sua severidade e tempo de duração, sendo elas inflamação aguda: caracterizada pelo rápido desenvolvimento e curto tempo de duração, maior migração de células polimorfonucleares para o local afetado, além dos cinco sinais cardeais: edema, calor, rubor, dor e perda da função; e inflamação crônica: perturbação prolongada, não estereotipada, pode surgir como resultado à não resolução da inflamação aguda e como respostas a injúrias de baixo grau ou latentes (TIZARD, 2002; SPINOSA et al., 2011).

Além disso, Kumar et al. (2010) enumeraram três principais componentes na resposta inflamatória aguda, sendo eles as alterações no calibre vascular, culminando em um aumento no fluxo sanguíneo; as mudanças estruturais nos microvasos que resultam na saída de proteínas plasmáticas e leucócitos da circulação e; a ativação dos leucócitos que emigraram da microcirculação para o sítio lesado.

Ainda, sobre a cinética da resposta inflamatória aguda, o estímulo lesivo desencadeia a produção de uma série de mediadores químicos oriundos de variadas fontes, como os de origem tissular (aminas vasoativas, citocinas, eicosanoides e fatores de agregação plaquetária) e os de origem plasmática (sistema complemento, sistema das cininas e sistema de coagulação) os quais agem primordialmente sobre eventos vasculares e celulares. Dentre os efeitos causados por esses mediadores, destaca-se a vasodilatação seguida pelo aumento da permeabilidade vascular, tal fenômeno facilita a passagem de proteínas plasmáticas dos vasos para o sítio lesado e conseqüentemente um grande volume de água, caracterizando o edema. Sincrônico a esse processo ocorrem os fenômenos celulares, caracterizados pela marginalização dos leucócitos e sua posterior migração para o sítio lesado. A migração

dessas células para o sítio de inflamação ocorre sob a influência de moléculas quiomitáxicas, sendo esse processo denominado de “diapedese” (TIZARD, 2002; KUMAR et al., 2010; SPINOSA et al., 2011).

Diversos estudos já foram realizados visando avaliar a influência dos mais variados fatores sobre a resposta inflamatória de peixes, seja ela de origem crônica ou aguda, como exemplo: a suplementação com vitaminas (BELO et al., 2005; MARTINS et al., 2008; BELO et al., 2012); probióticos (REQUE et al., 2010; DOTTA et al., 2011; CASTRO et al., 2014); aminoácidos, minerais e polissacarídeos (FALCO et al., 2012; CASTRO et al., 2014; MACHADO et al., 2015); fitoterápicos (DOTTA, 2013); a densidade de estocagem (BELO et al., 2005) e o efeito do estresse sobre a resposta inflamatória (MARTINS et al., 2004b). Para isso, alguns agentes flogógenos são utilizados, como a carragenina (MATUSHIMA & MATIANO, 1996; MARTINS et al., 2001; MARTINS et al., 2004b; MARTINS et al., 2008; MARTINS et al., 2009; DOTTA et al., 2011); tioglicolato (MARTINS et al., 2001; BOZZO et al., 2007; MARTINS et al., 2009; MORAES et al., 2013); lipopolissacarídeos (LPS) (MARTINS et al., 2004b; BOZZO et al., 2007; MARTINS et al., 2008; MORAES et al., 2013); bactérias inativadas (BOZZO et al., 2007; REQUE et al., 2010; CLAUDIANO et al., 2013; MORAES et al., 2013; CASTRO, et al., 2014; MACHADO et al., 2015) e lamínulas de vidro (BELO et al., 2005; BELO et al., 2012).

No Brasil, as espécies estudadas foram *Piaractus mesopotamicus* (BELO et al., 2005; BOZZO et al., 2007; GARCIA et al., 2007; GARCIA & MORAES, 2009; BELO et al., 2012; CLAUDIANO et al., 2013; MORAES et al., 2013; CASTRO, et al., 2014) e *Oreochromis niloticus* (MATUSHIMA & MATIANO, 1996; MARTINS et al., 2004b; MARTINS et al., 2008; REQUE et al., 2010; DOTTA et al., 2011), o híbrido tambacu (*P. mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) (MARTINS et al., 2001; MARTINS et al., 2009). Em adição, estudos da resposta inflamatória foram realizados em *Cyprinus carpio* (FALCO et al., 2012) e *Dicentrarchus labrax* (MACHADO et al., 2015).

Quando bem modulada e sob controle do organismo, a inflamação é uma resposta benéfica, entretanto quando não atende esses requisitos pode resultar em um papel patológico. Isto pelo fato de que os radicais de oxigênio altamente reativos liberados pelos neutrófilos durante sua explosão respiratória causam danos teciduais e persistência

da inflamação pela oxidação lipídica da membrana celular (TIZARD et al., 2002; KUMAR et al., 2010).

Dentro desse contexto, a utilização de produtos terapêuticos frente a patógenos ou que desempenhe a atividade anti-inflamatória surgem como alternativa ao controle de estados patológicos agravados ou culminados pela perda de controle do processo inflamatório.

Os tratamentos convencionais utilizados na criação de peixes empregam produtos químicos como formalina, diflubenzuron, sulfato de cobre e inseticidas organofosforados (MARTINS, 2004a), além do uso de antibióticos como oxitetraciclina, cloranfenicol e eritromicina. No entanto, tais substâncias são potencialmente poluentes do ambiente aquático e sua eficácia depende de uma série de fatores (BOYD & MASSAUT 1999; PAVANELLI et al., 2008). O uso indiscriminado dessas substâncias em ambientes aquáticos pode ocasionar impactos associados principalmente ao acúmulo de resíduos químicos na água resultando em poluição ambiental ou ainda à seleção de patógenos resistentes a antimicrobianos (COIMBRA et al., 2006; FIGUEIREDO & LEAL, 2008; CHAKRABORTY & HANCZ, 2013).

Como alternativa ao uso de antibióticos, a utilização de produtos naturais terapêuticos torna-se uma ferramenta de interesse para aquicultura. O uso dessas substâncias tem despertado o interesse por suas vantagens, como biodegradabilidade o que favorece a diminuição do impacto ambiental, menor toxicidade, menor probabilidade de selecionar patógenos resistentes e menor custo financeiro ao produtor (COIMBRA et al., 2006).

Fitoterápicos

Os produtos de origem natural em suas diversas formas de apresentação, como extratos, óleo essencial, entre outros, possuem diversas propriedades farmacológicas, como as atividades antibióticas, antiparasitárias, imunoestimulantes, provenientes dos terpenoides, esteroides, alcaloides advindos de seus pigmentos e metabolismo (BAKKALI et al., 2008).

Algumas substâncias possuem a capacidade de aumentar a resposta imunológica do organismo, sendo denominadas de imunoestimulantes, podendo aumentar a proteção aos organismos aquáticos contra diversas doenças, atuando sobre mecanismos imunológicos e reduzindo a mortalidade, além de serem utilizados de

modo profilático durante períodos críticos da produção (SAKAI, 1999; BRICKNELL & DALMO, 2005; BOYD et al., 2008).

Os quimioterápicos tradicionais, por sua vez, não possuem as características de fármaco ideal, como rápida degradabilidade, baixa ou ausente contaminação ambiental, entre outros fatores que restringem seu uso aos casos de extrema necessidade, devendo ser feito de forma cautelosa (PAVANELLI et al., 2008; ELER & MILLANI, 2007).

Os benefícios ligados a utilização de produtos naturais na aquicultura, já foram relatados em diversos estudos, em especial as atividades antiparasitárias, antimicrobianas e imunomoduladoras (SOARES & TAVARES-DIAS, 2013). Como exemplo da atividade antiparasitária, o extrato de alho *Allium sativum*, reduziu em 95% a infestação por parasito *Monogenea* em *Piaractus mesopotamicus* (MARTINS et al., 2002). Em brânquias de *Colossoma macropomum* suplementados com óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, Boijink et al. (2011) observaram redução do número médio de *Monogenea*, estando esse fenômeno associado ao aumento na concentração do óleo na dieta. Banhos terapêuticos contendo 15 mg L⁻¹ de óleo essencial de *O. gratissimum* pelo período de 15 min apresentaram 100% de eficácia contra *Monogenea* em *C. macropomum* (BOIJINK et al., 2011).

Recentemente, em relação à atividade imunomoduladora, a suplementação com *A. sativum* elevou o número total de leucócitos circulantes em *Lates calcifer* (TALPUR et al., 2012) e Dotta et al. (2014, 2015), observaram aumento no número de neutrófilos e monócitos circulantes em tilápia do Nilo suplementada por 15 dias com extrato de própolis a 0,5% ou extrato de *Aloe barbadensis*, bem como diminuição na abundância média de parasitos *Monogenea* nas brânquias.

Segundo Soares & Tavares-Dias (2013), é notório que o uso de produtos naturais tem se destacado na sanidade animal, devido às substâncias bioativas que apresentam boas perspectivas no combate a microrganismos e parasitos, além de seus resíduos farmacológicos não serem prejudiciais ao meio ambiente e representarem menos risco a saúde humana. Ainda, segundo os mesmos autores, tendo em vista seus potenciais de uso e a facilidade de produção massiva, as plantas do gênero *Lippia* vêm sendo exploradas em diversas áreas da medicina veterinária e da aquicultura.

Óleo essencial de *Lippia alba*

O gênero *Lippia*, pertencente à família Verbenaceae, compreende aproximadamente 200 espécies entre ervas, arbustos e pequenas árvores, sendo encontradas em países da América do Sul, Central e territórios tropicais da África (TERBLANCHE & KORNELIUS, 1996). *Lippia alba*, conhecida popularmente por diversos nomes, como: “erva-cidreira”, “erva-cidreira brasileira” ou “falsa melissa”, “salva-do-brasil”, chá-de-tabuleiro (LORENZI & MATOS, 2004) tem sido utilizada amplamente pela medicina popular brasileira, seja em forma de chás, macerado, em compressas, banhos ou extratos alcoólicos (JULIÃO et al., 2003).

Os óleos essenciais têm origem no metabolismo secundário das plantas, constituídos por diversos compostos voláteis ativos destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (SIANI et al., 2000; HARIKRISHNAN et al., 2011), estando esses compostos ligados ao sistema de defesa das plantas (KELSEY et al. 1984).

Os compostos presentes no óleo essencial apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente um deles em maior quantidade, sendo esse o composto majoritário, entretanto, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades, chamados de traços (SIMÕES et al 1999).

Em revisão, Pascual et al. (2001), relataram que diversos quimiotipos de *L. alba* já foram descritos, como os quimiotipos citral, carvona e limoneno, sendo eles nomeados de acordo com seu composto majoritário.

Segundo Soares e Tavares (2013), em espécies pertencentes ao gênero *Lippia* spp. a variação nos constituintes químicos e o volume de óleo essencial podem ocorrer devido a fatores ligados ao cultivo como disponibilidade de água e luz, temperatura, estágio de desenvolvimento da planta e estado nutricional. No entanto, Tavares et al. (2005), descreveram que as diferenças na composição química do óleo essencial extraído de diferentes quimiotipos de *L. alba* não resultam da influência de fatores ambientais mas são reflexo da variação genotípica entre as plantas visto que tais diferenças foram observadas em plantas cultivadas simultaneamente em um mesmo canteiro.

Quanto ao seu potencial fitoterápico Pascual et al. (2001), em revisão, relataram como propriedades farmacológicas a atividade anti-inflamatória, anti-microbiana, anestésica, sedativa, miorrelaxante, analgésica, anti-pirética, antiviral, citostática e anticonvulsivantes.

Alguns estudos têm sido realizados visando seu potencial farmacológico na aquicultura. Como exemplo, Saccol et al. (2013) estudaram a adição de diferentes concentrações do óleo essencial de *L. alba* (0 = controle, 0,25, 0,5, 1,0 ou 2,0 mL.kg⁻¹ de ração) na dieta de juvenis de jundiás *Rhamdia quelen* pelo período de 60 dias. Os autores observaram que a adição de óleo essencial de *L. alba* na dieta do jundiá diminuiu a peroxidação lipídica, aumentar as reservas de glicogênio e lactato e aumentar a resposta antioxidante dos tecidos.

Por sua vez, Cunha et al. (2010) testaram a eficiência do óleo essencial de *L. alba* como anestésico para *R. quelen*, sendo que nas concentrações que variaram de 100 a 500 mg L⁻¹ de *L. alba* mostraram eficácia na indução à anestesia. Além disso, o óleo essencial de *L. alba* inibiu o aumento nos níveis de cortisol no plasma, que pode ser causado pelo estresse de manipulação. Ainda segundo esses autores, a utilização do óleo não causou alterações sensoriais de odor ou sabor no filé extraído desses animais.

Ainda quanto a atividade anestésica da *L. alba*, Cunha et al. (2011), testaram diferentes concentrações (0, 10, 20, 50, 150, 300 e 450 µL de L⁻¹) do óleo essencial dessa planta, para indução anestésica em cavalos-marinhos (*Hippocampus reidi*), os autores observaram que aumento da concentração do óleo essencial, diminuiu proporcionalmente o tempo necessário para a indução da anestesia. Além disso, avaliaram a adição de 15 µL L⁻¹ como agente anti-estressor no transporte desses animais, pelo período de 4 ou 24 h, sendo que a inclusão do óleo essencial de *L. alba*, inibiu o aumento nos níveis de glicose no sangue, fenômeno provocado pela perturbação do transporte, além de evitar a linfopenia e neutrofilia respostas características de estresse.

Adicionalmente, Parodi et al. (2012) testaram o efeito anestésico do óleo essencial de *L. alba* para camarões *Litopenaeus vannamei* em diferentes estágios de vida. Para isso foram usadas as concentrações de 250, 500, 750 ou 1000 µL L⁻¹ de óleo essencial de *L. alba* para estágios sub-adultos e 400, 500 ou 600 µL de óleo essencial de *L. alba* para pós-larvas. As concentrações de 750 e 500 µL de óleo essencial de *L. alba*, mostraram-se mais eficientes para fins anestésicos em sub-adultos e pós larvas respectivamente. Além disso, a adição de óleo essencial de *L. alba* reduziu o estresse oxidativo desses animais.

Diversos estudos tem sido realizados afim de demonstrar o potencial fitoterápico de *L. alba*, entretanto ainda existem lacunas quanto as propriedades farmacológicas dessa planta corroborando estudos que tenham como objetivo elucidar e evidenciar os seus efeitos em diferentes organismos aquáticos.

JUSTIFICATIVA

O uso de fitoterápicos tem despertado grande interesse na piscicultura, visto que esses compostos possuem como princípios ativos produtos naturais do metabolismo das plantas. Dessa forma, espera-se que esses medicamentos possuam características desejáveis, atendendo não somente os requisitos terapêuticos como também aos ambientais e produtivos. Além disso, as características individuais de cada espécie corroboram a necessidade de estudos que visem elucidar os efeitos de fitoterápicos sobre os animais e, definir a posologia específica para cada espécie. Contudo, pouco se sabe sobre a ação de fitoterápicos sobre a resposta inflamatória em peixes. A maioria dos estudos avalia a composição dos componentes de exsudatos oriundos de diferentes sítios de inflamação induzida, como por exemplo, cavidade visceral, bexiga natatória e pele. A análise simultânea de parâmetros hematológicos, imunológicos e de componentes do exsudato inflamatório possibilita uma abordagem mais completa da resposta inflamatória.

HIPÓTESES

- A suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia alba* influencia a resposta inflamatória aguda e os parâmetros hemato-imunológicos em tilápia do Nilo.
- A suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia alba* reduz a migração de células imunitárias para o sítio de inflamação.
- Juvenis de tilápia suplementados com *Lippia alba* na ração apresentam maior capacidade imunológica, estando mais aptos a combater a inflamação aguda induzida na bexiga natatória.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Verificar a influência da adição de óleo essencial de *Lippia alba* na ração de tilápia do Nilo sobre a resposta inflamatória aguda e parâmetros hemato-imunológicos.

Objetivos específicos

- Verificar a atividade imunomoduladora da suplementação dietária com óleo essencial da planta *Lippia alba*.
- Observar as alterações no infiltrado inflamatório da bexiga natatória de animais suplementados em comparação com os não suplementados com *Lippia alba*.
- Quantificar leucócitos e diferenciá-los no infiltrado inflamatório.
- Verificar por meio da dosagem de cortisol, o nível de estresse dos animais submetidos ou não ao quadro de aerocistite.
- Verificar os parâmetros hematológicos de tilápias suplementadas ou não com *Lippia alba* na ração após inflamação experimentalmente induzida com carragenina.

CAPÍTULO 1

Suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia alba* sobre os parâmetros hemato-imunológicos de tilápia do Nilo

Jorge Pedro Rodrigues-Soares¹, Gabriel Fernandes Alves Jesus¹, Eduardo Luiz Tavares Gonçalves¹, Klayton Natan Moraes², Edsandra Chagas³, Marco Antônio de Andrade Belo⁴, Adolfo Jatobá², Maurício Laterça Martins¹

¹AQUOS-Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

²Laboratório de Aquicultura, Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari, Rod. BR 280 Km 27, 89245-000, Araquari, SC, Brasil.

³EMBRAPA Amazônia Ocidental, Rod. AM 010, km 29, Zona rural, 69010-970, Manaus, AM, Brasil

⁴Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), Laboratório de Farmacologia e Patologia Clínica, Av. Hilário da Silva Passos, 950, 13690-970, Descalvado, SP, Brasil.

O artigo será enviado para publicação no periódico **Fish & Shellfish Immunology** (ISSN: 1050-4648), tendo sido redigido segundo normas da revista.

Resumo

O presente estudo avaliou o efeito da suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia alba* sobre os parâmetros hemato-imunológicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas ao quadro de inflamação aguda induzida por injeção de carragenina na bexiga natatória. Pelo período de 45 dias, 96 peixes foram divididos em quatro tratamentos em triplicata, sendo eles: peixes suplementados com óleo essencial de *L. alba* (4 mL.kg⁻¹ de ração) injetados com carragenina; peixes suplementados com álcool de cereais injetados com carragenina; peixes não suplementados com óleo essencial injetados com carragenina; peixes não suplementados e não injetados. Seis horas após o estímulo inflamatório, foram analisados os níveis de cortisol sérico, eritrograma, leucograma e infiltrado inflamatório. Peixes injetados com carragenina apresentaram o quadro de inflamação aguda, caracterizado pela maior infiltração de neutrófilos e monócitos. O número de neutrófilos circulantes foi maior nos animais suplementados com *L. alba* quando comparado aos demais tratamentos ($p = 0,004$). Não houve diferença nos níveis de cortisol sérico. A suplementação com óleo essencial de *L. alba*, para a dose, tempo e forma de administração testadas, não apresentou atividade anti-inflamatória. Por outro lado, observou-se influência da suplementação dietária sobre o número total de neutrófilos após o quadro de aerocistite, destacando sua característica imunomoduladora.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, fitoterápicos, hematologia, inflamação.

Highlights

- Suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia alba* teve efeito imunomodulador em tilápia do Nilo.
- Suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia alba* manteve os parâmetros hematológicos após injeção de carragenina.
- A injeção de carragenina não alterou valores de cortisol sérico.
- Aerocistite aumentou o número de leucócitos e neutrófilos no sítio inflamatório.

Abstract

The present study evaluate the dietary supplementation with essential oil of *Lippia alba* on the hemato-immunological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) submitted to acute inflammation induced by carrageenin injection in the swim bladder. For a period of 45 days, 96 fish were divided in four treatments in triplicate, as follows: fish supplemented with essential oil of *L. alba* (4 mL.kg⁻¹ dry ration) injected with carrageenin; fish supplemented with cereal alcohol injected with carrageenin; fish non-supplemented with essential oil injected with carrageenin; fish non-supplemented and non-injected. Cortisol levels, erythrogram, leukogram and the inflammatory infiltrate were analyzed six hours after inflammatory stimulus. Fish injected with carrageenin showed acute inflammatory reaction characterized by higher infiltrate of neutrophils and monocytes. The circulating neutrophils number was higher in fish supplemented with *L. alba* when compared to other treatments ($p = 0.004$). No difference in cortisol levels was found. For dose, time and administration form tested, the supplementation with essential oil of *L. alba* did not present anti-inflammatory activity. On the other hand, it was observed influence of dietary supplementation on the neutrophils number after induced aerocystitis highlighting its immunomodulation characteristic.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, phytotherapics, hematology, inflammation.

1.Introdução

A capacidade de se livrar de corpos estranhos, microrganismos e tecidos danificados é essencial para a sobrevivência do organismo. A inflamação caracteriza-se como um processo protetor do organismo para tais situações, seja quanto a sinalização e eliminação da causa como bactérias, toxinas, ou do resultado (ex. tecidos necrosados) dessas injúrias[1]. Tal processo, é uma reação complexa do organismo em resposta a injurias advindas das mais variadas causas, tendo como resultado alterações químicas e morfológicas, especialmente dos vasos sanguíneos e das células imunocompetentes, presentes na circulação[1].

O estudo da inflamação e de possíveis estratégias para seu controle é de importância para produção aquícola, uma vez que tais estudos podem ser utilizados como suporte científico ao manejo de animais cultivados, já que estão em constante contato com agentes e substâncias que podem provocar um quadro inflamatório[2].

Assim sendo, diversos estudos já foram realizados visando avaliar a influência dos mais variados fatores sobre a resposta inflamatória de peixes, como por exemplo: a suplementação com vitaminas [3-5]; probióticos [6-8]; aminoácidos, minerais e polissacarídeos [9-11]; fitoterápicos[12]; a densidade de estocagem[3] e o efeito do estresse sobre a resposta inflamatória[13]. Para isso, alguns agentes flogógenos são utilizados, como a carragenina[2, 5, 6, 13-15]; tioglicolato[2, 14, 16, 17]; lipopolissacarídeos (LPS)[5, 13, 16, 17]; bactérias inativadas [7, 9, 10, 16-18] e lamínulas de vidro [3, 4]. No Brasil, as espécies estudadas foram *Piaractus mesopotamicus*[3, 4, 10, 16-20], *Oreochromis niloticus* [5-7, 13, 15] e o híbrido tambacu (*P. mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*)[2, 14].

Como visto, a caracterização do quadro de inflamação aguda em peixes é dificultosa, uma vez que a cinética celular relatada é vasta e fatores como espécie, agentes flogógenos e alimentação podem afetar diretamente o conteúdo celular do infiltrado inflamatório[16].

Dentro desse contexto, a utilização de produtos terapêuticos frente a patógenos ou que desempenhe a atividade anti-inflamatória surgem como alternativa ao controle de processos patológicos agravados ou culminados pela perda de controle do processo inflamatório.

Como alternativa ao uso de antibióticos, destaca-se a utilização de produtos naturais, pois apresentam baixo impacto ambiental e atendem características desejáveis como rápida degradação, ausência de resíduos na água, no substrato ou no tecido animal, além de não oferecer

riscos à saúde humana, apresentar baixo custo e facilidade de aplicação [21].

Benefícios ligados à aplicação de fitoterápicos já foram comprovados em diversos estudos, em especial as atividades antiparasitárias, antimicrobianas e imunomoduladoras[22]. Como exemplo da atividade antiparasitária, o extrato de alho *Allium sativum* reduziu em 95% o parasitismo por *Monogenea* em *Piaractus mesopotamicus*[23]. Em brânquias de *Colossoma macropomum* suplementados na ração com óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, houve redução do número de *Monogenea*, fenômeno associado ao aumento na concentração do óleo na dieta[24]. Banhos terapêuticos contendo 15 mg L⁻¹ de óleo essencial de *O. gratissimum* por 15 min apresentaram 100% de eficácia contra monogenea parasito de *C. macropomum*[25]. Com realação à atividade imunomoduladora, a suplementação dietária de *A. sativum* aumentou o número total de leucócitos circulantes em *Lates calcifer*[26]. Recentemente, observou-se aumento no número de neutrófilos e monócitos circulantes em tilápia do Nilo suplementada por 15 dias com extrato de própolis a 0,5% ou extrato de *Aloe barbadensis*[12], bem como redução na abundância média de parasitos *Monogenea* nas brânquias [12].

Segundo Soares & Tavares-Dias [22], é notório que o uso de produtos naturais tem se destacado na sanidade animal, devido às substâncias bioativas que apresentam boas perspectivas no combate a microrganismos e parasitos, além de seus resíduos farmacológicos não serem prejudiciais ao meio ambiente e representarem menos risco a saúde humana. Ainda, segundo os mesmos autores, tendo em vista seus potenciais de uso e a facilidade de produção massiva, as plantas do gênero *Lippia* vêm sendo exploradas em diversas áreas da medicina veterinária e da aquicultura.

Lippia alba, conhecida popularmente por diversos nomes, como: “erva-cidreira”, “erva-cidreira brasileira” ou “falsa melissa”, “salva-do-brasil”, chá-de-tabuleiro[27], tem sido utilizada amplamente pela medicina popular brasileira, seja em forma de chás, macerado, em compressas, banhos ou extratos alcoólicos[28].

Em revisão, Pascual e colaboradores[29], relataram como propriedades farmacológicas a atividade anti-inflamatória, anti-microbiana, anestésica, sedativa, miorrelaxante, analgésica, anti-pirética, antiviral, citostática e anticonvulsivantes

Na aquicultura, foi avaliada a utilização do óleo essencial de *L. alba* em diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 1,0 ou 2,0 mL de óleo essencial.kg⁻¹ de ração) na dieta de juvenis de *Rhamdia quelen* pelo

período de 60 dias, sendo recomendado seu uso por diminuir a peroxidação lipídica, aumentar as reservas de glicogênio e lactato e aumentar a resposta antioxidante dos tecidos[30].

Testando a eficiência do óleo essencial de *L. alba* como anestésico para *R. quelen*, observou-se o efeito anestésico nas concentrações de 100 a 500 mg L⁻¹, além de inibir o aumento nos níveis de cortisol no plasma, causado pelo estresse de manipulação e também não causar alterações sensoriais (odor ou sabor) no filé extraído dos animais[31].

Devido ao baixo número de estudos com fitoterápicos para tilápia do Nilo e por sua grande produtividade no Brasil, estudos que descrevam o efeito anti-inflamatório e sua relação com os parâmetros hemato-imunológicos são importantes na formação de estratégias preventivas contra enfermidades. Este estudo teve como objetivo verificar a influência da adição de óleo essencial de *L. alba* na ração de tilápia do Nilo sobre a resposta inflamatória aguda induzida por carragenina e parâmetros hemato-imunológicos.

2. Material e Métodos

2.1. Desenho Experimental

Foram utilizados 96 juvenis de tilápia do Nilo com $27,05 \pm 4,65$ g de peso inicial médio e $10,94 \pm 0,80$ cm de comprimento total médio, provenientes da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, unidade Camboriú. O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura do Instituto Federal Catarinense, Araquari. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, onde os animais foram divididos em quatro tratamentos com três repetições, compostos de 24 animais cada (oito por unidade experimental): peixes suplementados com óleo essencial de *L. alba* (4 mL.kg⁻¹ de ração) e injetados com carragenina (*L. alba*/carragenina); peixes suplementados com álcool de cereais e injetados com carragenina (álcool/carragenina); peixes não suplementados com óleo essencial e injetados com carragenina (ração/carragenina); peixes não suplementados e não injetados (ração).

Durante a aclimação e o período experimental os parâmetros de qualidade de água foram: oxigênio dissolvido $5,67 \pm 1,04$ mg.L⁻¹; temperatura $22,30 \pm 1,97^\circ\text{C}$ e pH $8,06 \pm 0,13$ medidos com multiparâmetro Hanna® HI9829 (Hanna Instruments Brasil, Barueri, SP).

Os procedimentos de manejo dos animais e coleta de amostras foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFSC (protocolo: 2014.0219).

2.2. Aclimação

Como forma de mitigação aos efeitos causados pelo estresse de transporte e confinamento, os animais utilizados nesse estudo foram aclimatados pelo período de 10 dias antes de iniciar o experimento, conforme preconizado[32]. Para isso, foram distribuídos conforme delineamento experimental, em 12 caixas d'água com capacidade para 1000 L e volume útil de aproximadamente 800 L, equipadas com sistema de recirculação, com filtros mecânicos e biológicos.

Durante o período de aclimação, todos os animais foram alimentados apenas com ração Guabi-Pirá® com 32% de proteína bruta.

2.3. Alimentação

Para os peixes suplementados com *L. alba*, o óleo essencial foi incorporado semanalmente na ração, seguindo a metodologia de Dairiki et al.[33], para cada quilo de ração Pirá® eram misturados 4 ml de óleo em 100 ml de álcool de cereais, que eram então aspergidos sobre os pellets, que por sua vez permaneciam secando por 24 h antes de serem armazenados em freezer para posterior utilização.

Os peixes suplementados apenas com o diluente foram alimentados com ração Pirá® aspergida apenas com o álcool de cereais.

Os peixes não suplementados foram alimentados com a mesma ração Pirá®, porém, sem a adição de nenhum outro composto. Os animais foram alimentados com dietas experimentais 2 vezes ao dia na proporção de 3% do peso pelo período de 45 dias. Foram realizadas biometrias semanais para ajuste da dieta.

Ao final do experimento os animais apresentavam peso médio de $46,52 \pm 9,36$ g e $13,59 \pm 0,88$ cm de comprimento total médio

2.4. Composição do óleo essencial de *Lippia alba*

A extração do óleo foi feita pelo método de hidrodestilação, com o uso do Aparelho Tipo Clevenger, pelo Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus,

Brasil. Após este procedimento, os óleos foram armazenados em recipiente âmbar e conservados em freezer a -18°C.

Devido a sua variabilidade química e morfológica a espécie *L. alba* pode ser dividida em diversos quimiotipos, de acordo com a predominância de alguns constituintes presentes no óleo essencial[29]. Conforme descrito na tabela 1, observa-se que o quimiotipo carvona-limoneno foi o utilizado no presente ensaio.

Tabela 1: Constituintes químicos do óleo essencial de *Lippia alba* N.E.Br.

%	IR	Composto
0.7	977	beta-pineno
3.5	989	Mirceno
17.5	1029	Limoneno
0.3	1037	(Z)-ocimeno
1.1	1048	(E)-ocimeno
1.6	1096	Linalol
0.2	1200	<i>trans</i> -di-hidro-carvona
0.4	1216	<i>trans</i> -carveol
61.7	1245	Carvona
0.6	1252	Piperitona
0.7	1337	piperitenona
0.5	1372	alfa-copaeno
0.4	1380	beta-bourboneno
0.3	1387	beta-elemeneno
1.8	1414	(E)-beta-cariofileno
0.2	1456	alfa-humuleno
2.7	1475	germacreno D
0.2	1497	alfa-muuroleno
0.5	1508	germacreno A
0.4	1517	gama-cadineno
0.4	1557	Nerolidol
0.3	1576	óxido de cariofileno
0.8	1641	beta-cedren-9-ona
Total identificado 96,6%		

IR: índice de retenção

2.5. Inflamação

Após o período de alimentação os animais foram anestesiados por imersão em eugenol (50 mg/L^{-1}) para indução do processo inflamatório realizado com injeção de $500 \mu\text{g}$ de carragenina (Marine Colloids[®]) dissolvida em $0,5 \text{ ml}$ de solução salina estéril, com agulha e seringa estéreis, na bexiga natatória. Seis horas após as injeções, os animais foram anestesiados com eugenol para amostragem de sangue, eutanasiados e o exsudato inflamatório obtido por lavagem da bexiga natatória com solução tampão PBS acrescida de $0,01 \text{ ml}$ de anticoagulante (EDTA 10%) e avaliado[2] com as seguintes modificações: diluição de 1:5 em fluido de Dacie [34].

2.6. Análises hematológicas

Para as análises hematológicas e ensaio inflamatório, foram coletados cinco animais de cada unidade experimental, totalizando 60 indivíduos. O sangue foi obtido por punção do vaso caudal, com auxílio de seringa de $3,0 \text{ mL}$ umedecida com EDTA a 10%, para confecção de extensões sanguíneas coradas pelo método de Rosenfeld modificado (MayGrünwald/Giemsa/Wright) para as contagens totais de trombócitos e leucócitos (WBC) e contagem diferencial de leucócitos[35]. Uma alíquota do sangue coletado foi usada para determinação do hematócrito e a outra alíquota transferida, em diluição de 1:200, para tubos “ependorf” contendo fluido de Dacie para a quantificação do número total de eritrócitos (RBC) com auxílio de Câmara de Neubauer e determinação da concentração de hemoglobina[35].

Para a dosagem do cortisol foram amostrados mais três animais de cada unidade, totalizando 36 indivíduos. O sangue foi obtido por punção do vaso caudal, com auxílio de seringa de $3,0 \text{ mL}$ sem anticoagulante, após coagulação a amostra foi centrifugada a 150 g por 10 min em centrífuga refrigerada (4°C) e o nível de cortisol foi medido com Cortisol ELISA kit (Enzo Life Sciences).

2.7. Análises estatísticas

Foram realizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett para verificar a normalidade e a homocedasticidade dos dados, sendo estes, submetidos posteriormente à análise de variância (ANOVA) unifatorial, e para comparação de médias, o teste Tukey utilizando o

software STATISTICA (Statsoft). Realizou-se a transformação dos dados quando pertinente, raiz de y para variáveis discretas e arco seno raiz y para variáveis em porcentagem. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3.Resultados

3.1.Cortisol

As análises apresentaram elevados valores de cortisol, no entanto não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Fig. 1).

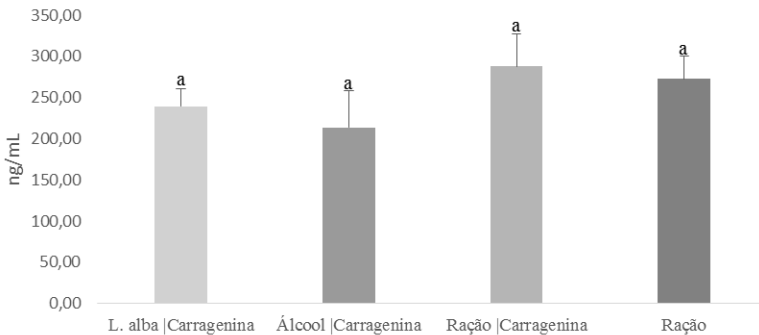


Figura 1. Valores médios \pm desvio padrão do cortisol sérico de tilápia do Nilo suplementada com óleo essencial de *Lippia alba*, álcool de cereais e não suplementadas, após indução de aerocistite por injeção de carragenina, e grupo não suplementado não injetado (ração).

3.2.Hematologia

Não houve alterações significativas entre os tratamentos nos parâmetros hematológicos que compunham o eritrograma (Tabela 2). Nas análises referentes ao leucograma (WBC e contagem diferencial de leucócitos), os peixes suplementados com *L. alba* apresentaram maior número de neutrófilos circulantes do que os demais. Os números de WBC, trombócitos, linfócitos e monócitos não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 2: Valores médios \pm desvio padrão do eritograma de tilápia do Nilo suplementadas com óleo essencial de *Lippia alba*, álcool de cereais e não suplementadas, após indução de aerocistite por injeção de carragenina, e grupo não suplementado não injetado (ração).

Parâmetros	Tratamentos			
	<i>L. alba</i> Carragenina	Álcool Carragenina	Ração Carragenina	Ração
Hemoglobina	7,57 \pm 2,17	7,62 \pm 2,43	9,76 \pm 3,19	8,14 \pm 3,26
Hematócrito (%)	30,00 \pm 3,84	27,93 \pm 6,17	32,30 \pm 7,86	31,37 \pm 4,55
RBC ($\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	2,78 \pm 0,90	2,16 \pm 0,58	2,75 \pm 0,75	3,00 \pm 0,96
Trombócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	35,42 \pm 13,96	75,27 \pm 47,47	63,56 \pm 38,34	30,09 \pm 15,72
VCM (fL)	118,43 \pm 38,56	134,43 \pm 28,76	125,12 \pm 44,72	115,93 \pm 41,82
CHCM (g·dL ⁻¹)	25,10 \pm 6,07	27,59 \pm 6,68	31,39 \pm 11,41	26,07 \pm 9,98
HCM (pg)	30,36 \pm 14,74	36,96 \pm 12,45	36,34 \pm 9,29	29,31 \pm 12,56

RBC: número total de eritrócitos, VCM: volume corpuscular médio, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, HCM: hemoglobina corpuscular média. *Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Tabela 3: Valores médios \pm desvio padrão do leucograma de tilápia do Nilo suplementadas com óleo essencial de *Lippia alba*, álcool de cereais e não suplementadas, após indução de aerocistite por injeção de carragenina, e grupo não suplementado não injetado (ração).

Parâmetros	Tratamentos			
	<i>L. alba</i> Carragenina	Álcool Carragenina	Ração Carragenina	Ração
WBC ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	105,46 \pm 45,87 a	88,21 \pm 33,89 a	94,52 \pm 35,58 a	100,78 \pm 43,31 a
Linfócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	71,00 \pm 39,77 a	68,96 \pm 28,87 a	71,83 \pm 32,54 a	89,95 \pm 41,19 a
Neutrófilos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	33,05 \pm 14,72 a	16,72 \pm 7,70 b	20,20 \pm 12,52 b	8,30 \pm 3,03 b
Monócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	2,28 \pm 1,22 a	2,53 \pm 1,39 a	2,72 \pm 1,27 a	2,88 \pm 1,99 a

WBC: contagem total de leucócitos. *Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

3.3. Infiltrado Inflamatório

A contagem total de leucócitos dos peixes não suplementados injetados com carragenina não apresentou diferença comparada com a dos suplementados com álcool de cereais e injetados, no entanto, ambos diferiram dos animais controle que apresentaram o menor valor de células no infiltrado. Os peixes suplementados com *L. alba* injetados com carragenina não diferiram dos demais tratamentos (Fig. 2).

A contagem diferencial de leucócitos apresentou os seguintes resultados: o número de linfócitos não diferiu entre os peixes de todos os tratamentos; os animais não suplementados apresentaram menor quantidade de neutrófilos diferindo dos demais grupos, sendo que os suplementados com *L. alba* injetados com carragenina, não suplementados injetados com carragenina e suplementados com álcool de cereais injetados com carragenina não diferiram entre si (Fig. 2).

Quanto ao número de macrófagos, os peixes não suplementados injetados com carragenina apresentaram maiores valores comparados com os não suplementados não injetados. Os peixes suplementados com álcool de cereais injetados com carragenina não apresentaram diferença quando comparados com os suplementados com *L. alba* injetados com carragenina (Fig. 2).

O número de eosinófilos foi menor nos animais não suplementados não injetados com carragenina e nos suplementados com *L. alba* injetados com carragenina e não diferiram dos animais suplementados com álcool de cereais injetados com carragenina (Fig. 2).

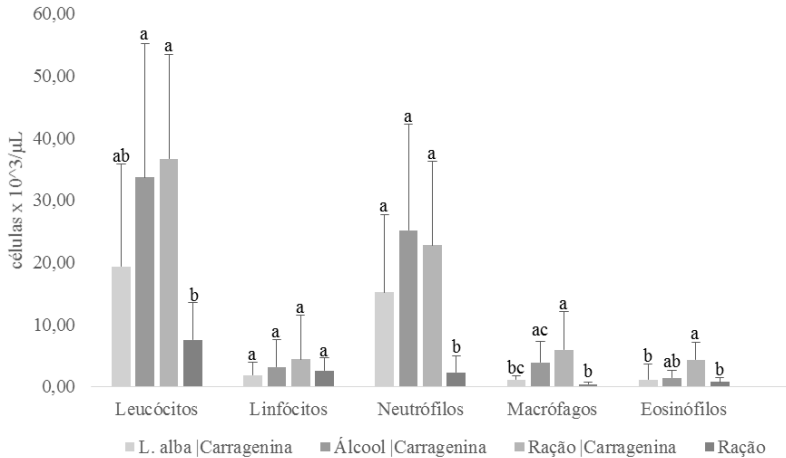


Figura 2. Valores médios e desvio padrão da contagem total e diferencial de leucócitos do infiltrado inflamatório de tilápia do Nilo suplementada com *Lippia alba*, álcool de cereais e não suplementadas, após indução de aerocistite por injeção de carragenina, e grupo não suplementado não injetado (ração). Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

4. Discussão

4.1. Cortisol

O cortisol é um dos principais hormônios produzidos em situações de estresse [36, 37], sendo usado como bio-indicador em trabalhos que visam avaliar o bem-estar e as respostas fisiológicas frente a fatores estressantes.

Os valores de cortisol encontrados no presente ensaio foram superiores aos relatados em tilápia do Nilo, submetidas a estresse único ou consecutivo e injetadas com diferentes flogógenos[13]. Superiores também ao observado em tilápia do Nilo suplementadas por 30 dias com vitamina C e E (500 mg.kg⁻¹ de ração), nas quais um quadro de inflamação aguda foi induzido pela injeção de carragenina e lipopolissacarídeo (LPS)[5].

Estima-se que os elevados valores aqui encontrados não sejam resultantes do processo inflamatório, já que os grupos injetados não

diferiram estatisticamente do grupo não injetado. Assim, infere-se que tais valores sejam conseqüências do estresse agudo causado pelo manejo pré-coleta, como, a captura dos animais e sua exposição ao ar para retirada da unidade experimental, visto que tal fator já foi relatado anteriormente como agente estressor em tilápia do Nilo[38, 39].

Assim sendo, afirma-se que os valores de cortisol encontrados não exerceram influência na resposta inflamatória dos animais aqui testados.

4.2.Hematologia

A suplementação com *L. alba*, não exerceu influência negativa sobre os parâmetros eritrocitários e trombocitários, uma vez que se mantiveram estatisticamente iguais entre todos os tratamentos. Resultados semelhantes foram observados em ensaio realizado com juvenis de tilápia do Nilo, suplementados ou não com o probiótico *Lactobacillus plantarum* (1×10^9 unidades formadoras de colônias (UFC).mL⁻¹, na proporção de 100 mL.kg⁻¹ de ração seca), nos quais após 15 dias de alimentação foram injetados 500 µg carragenina na bexiga natatória, para a indução do quadro de inflamação aguda[6], demonstrando que assim como a utilização do *L. plantarum* na dieta, o óleo essencial de *L. alba* não causa prejuízos ao processo de hematopoese da tilápia.

O processo inflamatório induzido no presente trabalho não causou alterações nos parâmetros hematológicos, visto que os animais injetados com carragenina não diferiram dos animais não injetados. Diferentemente, após infecção experimental com injeção de *Enterococcus* sp. (1×10^3 e 1×10^6 UFC.mL⁻¹) na bexiga natatória de tilápia do Nilo observou-se aumento no percentual de hematócrito e na contagem total de trombócitos nos animais injetados com a bactéria[40]. Diferindo do processo infeccioso, o quadro de inflamação pode não ser fator determinante para alteração desses parâmetros.

Apesar de não observado no presente estudo, a suplementação com fitoterápicos pode influenciar nos parâmetros hematológicos de algumas espécies, como exemplo, em *Cyprinus carpio* a suplementação por 60 dias com diferentes concentrações (0; 0,1%; 0,5%; 1%) de extrato cru de *Aloe vera* na dieta, determinou alterações nos valores de hematócrito, VCM, RBC e hemoglobina[41]. Os animais suplementados com 0,5 e 1% de *A. vera* apresentaram níveis maiores de hematócrito e VCM do que os animais suplementados com 0,1% e controle[41]. A

concentração de hemoglobina e o número de RBC nos peixes suplementados com 1% de *A. vera* foram maiores do que os observados nos animais não suplementados[41], sugerindo influência sobre a hematopoiese de *C. carpio*[41].

Adicionalmente, a suplementação de *Rutilus frisii kutum* em diferentes concentrações (1, 2 e 3%), de extratos de *Mentha piperita* por 8 semanas resultando em aumento do número de RBC e hemoglobina dos animais que receberam as concentrações de 2% e 3%, e no hematócrito dos animais suplementados com 3%[42].

Diferentemente, não se observou alterações nos parâmetros eritrocitários dos animais suplementados com *L. alba*. Assim como relatado no presente estudo, tilápia do Nilo suplementada com vitamina C (500 mg.kg⁻¹) ou inulina (5 g.kg⁻¹) avaliada após 1 e 2 meses de suplementação[43], não apresentaram alterações nos valores eritrocitários.

Corroborando o presente estudo, Saccol e colaboradores estudando a adição de diferentes concentrações do óleo essencial de *L. alba* (0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mL.kg⁻¹ de ração) na dieta de juvenis de *R. quelem* pelo período de 60 dias, não observaram influência sobre os parâmetros hematológicos desses animais[44]. Infere-se que na concentração testada e o período de administração utilizado nesse estudo, o óleo essencial de *L. alba* não apresentou melhorias quanto aos parâmetros eritrocitários e trombocitários, entretanto não foi deletério para os peixes.

Os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si nas contagens de WBC e de trombócitos circulantes na forma em que foi avaliado. Contrariamente ao verificado neste estudo, em trabalho semelhante, foi analisada a resposta inflamatória de tilápia do Nilo suplementada com vitamina C e E após 30 dias de alimentação e indução de inflamação com carragenina e LPS, não observando alterações no número de RBC e no percentual de hematócrito, mas redução no número de trombócitos circulantes[5]. A menor ocorrência de células de defesa e trombócitos na circulação pode estar relacionada à sua migração para o sítio de inflamação[5], entretanto, tal fenômeno não foi observado no presente ensaio, visto que apesar da migração eficiente de células para o sítio lesado, os valores de células circulantes não diferiram entre animais injetados e não injetados.

A migração dessas células para o sítio de inflamação ocorre sob a influência de moléculas quimiotáticas, sendo esse processo denominado de “diapedese”[45]. No presente estudo, a suplementação com *L. alba* e a indução de inflamação, não foram fatores determinantes

para causar alterações nos números de WBC, trombócitos, monócitos e linfócitos circulantes. Acredita-se que a indução de inflamação tenha sido homogênea em todos os grupos injetados, verificada pela infiltração leucocitária, ainda, o curto prazo de avaliação (6 h após indução de inflamação) pode não ter sido suficiente para se observar alterações sistêmicas nesses parâmetros, uma vez que os grupos injetados não diferiram do grupo não suplementado não injetado.

Assim como relatado no presente estudo o aumento no número de neutrófilos também foi relatado anteriormente[6], em ensaio realizado com tilápia do Nilo, suplementada ou não com probiótico *L. plantarum*, nas quais após 15 dias de alimentação foi realizada a indução do quadro de inflamação aguda, observando que nos animais suplementados e injetados com carragenina, também após 6 horas, apresentaram maior número dessas células.

A resposta imunológica inespecífica à fatores patogênicos, tem como principal mecanismo a fagocitose[46]. Os neutrófilos participam ativamente do sistema de defesa inato dos peixes, sendo os principais agente fagocitários, responsáveis pela defesa do organismo frente à infecções bacterianas[35]. Apesar de não influenciar na contagem de WBC, acredita-se que a suplementação com *L. alba*, venha ser benéfica, uma vez que os animais submetidos ao quadro de inflamação, apresentaram quadro de neutrofilia. Desse modo, infere-se que os peixes apresentariam maior capacidade de defesa celular quando expostos à um estímulo lesivo. Diversos produtos naturais podem conferir a ativação de defesas específicas e não-específicas em peixes teleósteos[47].

4.3. Infiltrado Inflamatório

A observação do maior acúmulo de células envolvidas na resposta inflamatória nos animais injetados comparado com os não suplementados não injetados, demonstra que a inoculação de carragenina teve sucesso para determinação da aerocitose. A eficiência do flogógeno utilizado já foi relatado anteriormente[2, 6, 14, 15].

No presente estudo, observou-se que a adição de *L. alba* na ração não exerceu influência sobre o número de células no infiltrado inflamatório. Tal resultado diferiu do relatado por Saccol e colaboradores, que avaliando o processo inflamatório com injeção de *Streptococcus agalactiae* inativada na bexiga natatória de tilápias suplementadas com dietas contendo óleo de soja e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de *Sacharomyces cerevisiae* após 12, 24 e 48 h da

aplicação, observaram a ocorrência de maior acúmulo de células fagocíticas no foco inflamatório de animais suplementados com óleo de soja e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de *S. cerevisiae* quando comparados aos não suplementados[48].

Adicionalmente, *Piaractus mesopotamicus* suplementados com carboxilato de cromo (0, 12, 18 e 36 mg.kg⁻¹ de ração) por 90 dias apresentaram aumento na resposta inflamatória com maior acúmulo de linfócitos e trombócitos nos animais injetados na bexiga natatória com *A. hydrophila* (3 x 10⁹ UFC inativada) suplementados com 18 e 36 mg de cromo.kg⁻¹ de ração[16]. Assim sendo, diferentemente dos compostos anteriormente citados, a adição de óleo essencial de *L. alba* na ração, não exerce influência sobre a infiltração celular para sítio lesado em *O. niloticus*, visto que o volume celular dos animais suplementados foi estatisticamente igual ao dos não suplementados.

No presente estudo, após 6 h do estímulo inflamatório, observou-se maior acúmulo de neutrófilos, nos grupos injetados, independente da alimentação. Tais achados corroboram a cinética inflamatória do processo agudo[45], os quais reportam que nos primeiros momentos da inflamação aguda, ocorre a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório, uma vez que estas células possuem maior mobilidade, sendo acompanhadas posteriormente pela migração de monócitos circulantes e macrófagos residentes.

Os achados referentes às características celulares do infiltrado inflamatório, contrastam com os relatados em tilápia do Nilo, suplementadas ou não com probiótico *L. plantarum*, com aerocistite induzida pela injeção de carragenina, 15 dias depois da suplementação, onde verificaram que após 6 h da aplicação do estímulo lesivo, o conteúdo inflamatório era composto principalmente por macrófagos e granulócitos[6].

Neste estudo não se observou ação anti-inflamatória para o tempo testado, acreditando-se que assim como relatado em estudo prévio[18], exista a necessidade de se testar em tempos distintos o efeito de drogas anti-inflamatórias. Claudiano et al. (2013), testaram o efeito de três diferentes drogas anti-inflamatórias (dexametasona, indometacina e meloxicam) em *P. mesopotamicus* pré-tratados com as drogas 30 min antes de serem submetidos ao quadro de inflamação aguda por injeção de *A. hydrophila* inativada (3 x 10⁹ UFC) na bexiga natatória. Os autores avaliaram a permeabilidade vascular e o conteúdo celular do infiltrado inflamatório 6, 24 e 48 h após injeção, encontrando efeitos anti-inflamatórios, como a redução no número de células do infiltrado, somente 24 h após estímulo[18].

A ação de drogas anti-inflamatórias está condicionada a diversos fatores, como posologia, sítio de ação e local de intervenção na cascata inflamatória, sendo necessário que inúmeras variáveis além da droga administrada sejam testadas.

Além disso, a eliminação dos agentes causadores ou dos produtos oriundos da lesão tecidual é essencial para resolução do processo inflamatório[1], justificando a utilização de substâncias que estimulem um incremento nas células responsáveis por esse processo.

Conclusão

Para a dose testada, tempo e forma de administração na tilápia o óleo essencial de *L. alba* não desempenhou atividade anti-inflamatória.

A suplementação, exerceu influência sobre o número total de neutrófilos após o quadro de aerocistite destacando sua característica imunomoduladora.

Ressalta-se que a suplementação com óleo essencial de *L. alba* não atuou de forma negativa sobre os parâmetros eritrocitários.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pela bolsa de Mestrado à J.P. Rodrigues-Soares; CNPq pela bolsa de Produtividade em Pesquisa à M.L. Martins (365869-14-0); ao Laboratório de Piscicultura do Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari, por disponibilizar a estrutura para realização do trabalho; à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Ocidental pela disponibilização do fitoterápico; à Empresa de Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) Unidade Camboriú e Fundação Municipal de Desenvolvimento Rural 25 de Julho por cederem os animais; ao Dr. Carlos Rogério Tonussi do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela disponibilização da carragenina à Empresa Guabi por ceder a ração. Ao Dr. Evoy Zaniboni Filho, Dr. José Luiz Pedreira Mouriño e Dra. Gabriela Tomas Jerônimo pela revisão crítica do manuscrito antes da submissão.

Referências

- [1] Kumar V, Abbas AK, Nelson F, Aster J. (eds) Robbins e Cotran. Patologia: bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

- [2] Martins M, Onaka E, Tavares-Dias M, Bozzo F, Malheiros E. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. *Rev Ictiol* 2001; 9: 25-31.
- [3] Belo MAA, Schalch SHC, Moraes FR, Soares VE, Otoboni AMMB, Moraes JER. Effect of Dietary Supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. *J Comp Pathol* 2005; 133: 146-54.
- [4] Belo MAA, Moraes JRE, Soares VE, Martins ML, Brum CD, Moraes FR. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. *Pesq Agropec Bras* 2012; 47: 1015-21.
- [5] Martins ML, Miyazaki DMY, Moraes FR, Ghiraldelli L, Adamante WB, Mouriño JLP. Vitamin C and E supplemented diet influences the acute inflammatory response in Nile tilapia. *Ciência Rural* 2008; 38: 213-8.
- [6] Dotta G, Mouriño JLP, Jatobá A, Morán REB, Pilati C, Martins ML. Acute inflammatory response in Nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. *Acta Sci Biol Sci* 2011; 33: 239-46.
- [7] Reque VR, Moraes JRE, Belo MAA, Moraes FR. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Aquaculture* 2010; 300: 37-42.
- [8] Castro MP, Claudiano GS, Petrillo TR, Shimada MT, Belo MAA, Marzocchi-Machado CM, Moraes JR, Manrique GW, Moraes FR. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fish & Shellfish Immunol* 2014; 36: 284-90.
- [9] Machado M, Azeredo R, Díaz-Rosales P, Afonso A, Peres H, Oliveira Teles A, Costas B. Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. *Fish & Shellfish Immunol* 2015; 42: 353-62.
- [10] Castro MP, Claudiano GS, Bortoluzzi NL, Garrido E, Fujimoto RY, Belo MAA., Shimada MT, Moraes JRE, Moraes FR. Chromium carbochelate dietary supplementation favored the glucocorticoid response during acute inflammation of *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture* 2014; 432: 114-8.

- [11] Falco A, Frost P, Miest J, Pionnier N, Irnazarow I, Hoole D. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. *Fish & Shellfish Immunol* 2012; 32: 1051-7.
- [12] Dotta G, Brum A, Jerônimo GT, Maraschin M, Martins ML. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. *Braz J Vet Parasitol* 2015; 24(1): 66-71.
- [13] Martins ML, Pilarsky F, Onaka EM, Nomura DT, Fenerick Jr J, Ribeiro K, Myiazaki DMY, Castro MP, Malheiros EB. Haematology and acute inflammatory response of *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submitted to a single and consecutive stress of capture. *Bol Inst Pesca* 2004; 30(1): 71-.
- [14] Martins ML, Myiazaki DMY, Tavares-Dias M, Fenerick J, Onaka EM, Bozzo FR, et al. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male \times *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). *Braz J Biol* 2009; 69: 957-62.
- [15] Matushima ER, Matiano M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Braz J Vet Res Anim Sci* 1996; 33: 5-10.
- [16] Bozzo FR, Moraes JRE, Moraes FR, Pereira GT, Tavares-Dias M, Onaka EM. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). *J World Aquac Soc* 2007; 38: 302-8.
- [17] Moraes JRE, Bozzo FR, Ozorio ROA, Engrácia Filho JR, Moraes FR. Acute aerocystitis induced by thioglycolate, lipopolysaccharide and inactivated *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*: hematological effects. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2013; 49:.
- [18] Claudiano GS, Petrillo TR, Manrique WG, Castro MP, Loureiro BA, Marcusso PF, Belo MAA, Moraes JRE, Moraes FR. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: Participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. *Fish & Shellfish Immunol* 2013; 34: 1057-62
- [19] Garcia F, Pilarski F, Onaka EM, Moraes FR, Martins ML. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 2007; 271: 39-46.

- [20] Garcia F, Moraes FR. Hematology and clinical signs of *Piaractus mesopotamicus* experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. Acta Sci Biol Sci 2009; 31: 17-21.
- [21] Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: Eduem; 2008.
- [22] Soares BV, Tavares-Dias, M. The *Lippia* species (Verbenaceae), and its potential bioactive and importance for veterinary medicine and aquaculture. Biota Amazônia 2013; 3:109-23.
- [23] Martins ML, Moraes FR, Miyazaki DM, Brum CD, Onaka EM, Fenerick Jr J, Bozzo FR. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatius* (Monogenea: Dactylogyridae) infection in cultivated pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and its haematological effects. Parasite 2002; 9: 175-80.
- [24] Chagas EC, Dairiki JK, Boijink CL, Inoue L, Chaves FC. Inclusão do óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) na dieta do tambaqui (*Colossoma macropomum*) para controle de monogenoides. In: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos 2011 11: 2012.
- [25] Boijink CL, Inoue L, Chagas E, Chaves F. Boas práticas de manejo na piscicultura para conservação da qualidade ambiental: uso de produtos naturais como anti-helmíntico em tambaqui. Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em anais de congresso (ALICE): In: Seminário Produtividade Agropecuária e Benefícios Socioambientais das Pesquisas da Embrapa Amazônia Ocidental, 1., 2011, Manaus. Anais... Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2011. p. 41-45.(Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 88). 2011.
- [26] Talpur AD, Ikhwanuddin M. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). Aquaculture 2012; 364-365: 6-12.
- [27] Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. . Instituto Plantarum 2004:512.
- [28] Julião LS, Tavares ES, Lage CLS, Leitão SG. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). Rev Bras Farmacognosia 2003 13:36-8.
- [29] Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. J Ethnopharmacol 2001; 76: 201-14.
- [30] Saccol EMH, Uczay J, Pes TS, Finamor IA, Ourique GM, Riffel APK, Schmidt D, Caron BO, Heinzmann BM, Llesuy SF, Lazzari

- R, Baldisserotto B, Pavanato MA. 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* 2013; 416: 244-54.
- [31] Cunha MAd, de Barros FMC, de Oliveira Garcia L, de Lima Veeck AP, Heinzmann BM, Loro VL, et al. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 2010; 306: 403-6.
- [32] Barcellos LG, Souza SMG, Lucero, L.F. Preliminary study on serum cortisol as indicative of stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bol Inst Pesca* 1997; 24: 239 - 45.
- [33] Dairiki JK, Majolo C, Chaves FCM, Oliveira MR, Morais IS. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. In: Ocidental EA, editor. Manaus; 2013.
- [34] Blaxhall PC, Daisley KW. Routine haematological methods for use with fish blood. *J Fish Biol* 1973; 5: 771-81.
- [35] Ranzani-Paiva M, Pádua S, Tavares-Dias M, Egami M. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: EDUEM. 2013.
- [36] Balm PH, Lambert JD, Wendelaar Bonga SE. Corticosteroid biosynthesis in the interrenal cells of the teleost fish, *Oreochromis mossambicus*. *Gen Comp Endocrinol* 1989; 76: 53-62.
- [37] Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiol Rev* 1997; 77: 591-625.
- [38] Silva RD, Rocha LO, Fortes BDA, Vieira D, Fioravanti MCS. Hematological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) under air exposure stress. *Pesq Vet Bras* 2012; 32: 99-107.
- [39] Barcellos LJG, Nicolaiewsky S, De Souza SMG, Lulhler F. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquac Res* 1999; 30: 437-44.
- [40] Martins ML, Mourino JL, Amaral GV, Vieira FN, Dotta G, Jatoba AM, et al. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Braz J Biol* 2008; 68: 657-61.
- [41] Alishahi M, Abdy E. Effects of different levels of *Aloe vera* L. extract on growth performance, hemato-immunological indices of *Cyprinus carpio* L. *Iranian J Vet Sci Technol* 2013; 5(2): 33-44.
- [42] Adel M, Abedian Amiri A, Zorriehzahra J, Nematollahi A, Esteban MÁ. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish & Shellfish Immunol* 2015; 45: 841-47.

- [43] Ibrahem MD, Fathi M, Mesalhy S, Abd El-Aty AM. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunol* 2010; 29: 241-6.
- [44] Saccol EMH, Uczay J, Pes TS, Finamor IA, Ourique GM, Riffel APK, Schmidt D, Caron BO, Heinzmann BM, Llesuy SF, Lazzari R, Baldisserotto B, Pavanato MA. 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* 2013; 416: 244-54.
- [45] Tizard I. Imunidade inata: inflamação. In: *Imunologia Veterinária*. 6ª ed. São Paulo: Roca: 2002. pp. 39-50.
- [46] Ranzani-Paiva MJT, Silva-Souza A. Hematologia de peixes brasileiros. *Sanidade de organismos aquáticos* São Paulo: Editora Varela. 2004:89-120.
- [47] Sakai M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 1999; 172: 63-92.
- [48] Sakabe R. Lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* para tilápia de Nilo na inflamação e no desempenho produtivo: Universidade Estadual Paulista; 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os relatos da atividade anti-inflamatória e demais características farmacológicas da planta *Lippia alba*, sugere-se que novos estudos sejam realizados, testando-se novas formas de administração, tempos de suplementação e espécies. Além disso, a execução de novas análises que venham a elucidar o processo inflamatório agudo em peixes.

A suplementação com o óleo essencial pode auxiliar na prevenção de alterações na homeostase dos animais quando expostos à agentes estimuladores tanto flogógenos como patógenos. Consequentemente, estudos sobre a suplementação com este óleo essencial em peixes parasitados ou infectados experimentalmente merecem atenção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BELO, M. A. D. A.; MORAES, J. R. E. D.; SOARES, V. E.; MARTINS, M. L.; BRUM, C. D.; MORAES, F. R. D. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacu. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 47, p. 1015-1021, 2012.

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. Effect of Dietary supplementation with vitamin e and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **J. Comp. Pathol.**, v. 133, n. 2-3, p. 146-154, 2005.

BOIJINK C. L.; INOUE L.; CHAGAS E.; CHAVES F. Boas práticas de manejo na piscicultura para conservação da qualidade ambiental: uso de produtos naturais como anti-helmíntico em tambaqui. Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em anais de congresso (ALICE): In: Seminário Produtividade Agropecuária e Benefícios Socioambientais das Pesquisas da Embrapa Amazônia Ocidental, 1., 2011, Manaus. Anais... Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2011. p. 41-45.(Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 88). 2011.

BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E.; RUASDE MORAES, F.; PEREIRA, G. T.; TAVARES-DIAS, M.; ONAKA, E. M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). **J. World Aquac. Soc.**, v. 38, n. 2, p. 302-308, 2007.

BOYD, C.E.B.; LIM, C.; QUEIROZ, J.; SALIE, K.; DE WET, L.; MCNEVIN, A. **Best management practices for responsible aquaculture**. USAID: Aquaculture Collaborative Research Support Program, 47 p., 2008.

BOYD, C.E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquac. Eng.**, v. 20, n. 2, p. 113-132, 1999.

BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunol.**, v. 19, p. 457-472, 2005.

CASTRO, M. P. D.; CLAUDIANO, G. S.; BORTOLUZZI, N. L.; GARRIDO, E.; FUJIMOTO, R. Y.; BELO, M. A. A.; SHIMADA, M. T.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Chromium carbochelate dietary supplementation favored the glucocorticoid response during acute inflammation of *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 432, n. 0, p. 114-118, 2014.

CASTRO, M. P.; CLAUDIANO, G. S.; PETRILLO, T. R.; SHIMADA, M. T.; BELO, M. A. A.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; MORAES, J. R. E.; MANRIQUE, G. W.; MORAES, F. R. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*. **Fish & Shellfish Immunol.**, v. 36, n. 1, p. 284-290, 2014.

CLAUDIANO, G. D. S.; PETRILLO, T. R.; MANRIQUE, W. G.; CASTRO, M. P.; LOUREIRO, B. A.; MARCUSSO, P. F.; BELO, M. A. A.; MORAES, J. R. E.; DE MORAES, F. R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: Participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish & Shellfish Immunol.**, v. 34, n. 5, p. 1057-1062, 5// 2013.

CHAKRABORTY, S.B.; HANCZ, C. Application of phytochemicals as immunostimulant as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. **Rev. Aquacult.**, v. 3, p. 103-119, 2013.

COIMBRA, J.L.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S.; SOUZA, C.S.; RIBEIRO, F.L.B. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 41, p. 1209-1211, 2006.

CUNHA, M.A.D.; BARROS, F.M.C.; GARCIA L.O.; VEECK, A.P.L.; HEINZMANN, B.M.; LORO, V.L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 403-406, 2010.

CUNHA, M. A.; SILVA, B. F.; DELUNARDO, F. A. C.; BENOVI, S. C.; GOMES, L. C.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the

essential oil of *Lippia alba*. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 9, n. 3, p. 683-688, 2011.

DOTTA, G. **Efeito imunomodulador dos extratos de própolis e *Aloe barbadensis*, suplementados na dieta de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*** . 2013. 124 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.

DOTTA, G.; ANDRADE, J.I.A.; GONÇALVES, E.L.T.; BRUM, A.; MATTOS, J.J.; MARASCHIN, M.; MARTINS, M.L.M. Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and *Aloe barbadensis*. **Fish & Shellfish Immunol.**, v. 39, p. 280-284, 2014.

DOTTA, G.; BRUM, A.; JERÔNIMO, G.T.; MARASCHIN, M.; MARTINS, M.L. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 24, n. 1, p. 66-71, 2015.

DOTTA, G.; MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; MORÁN, R. E. B.; PILATI, C.; MARTINS, M. L. Acute inflammatory response in Nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 33, n. 3, p. 239-246, 2011.

ELER, M.N.; MILLANI, T.J. Métodos de estudos de sustentabilidade aplicados a aquicultura. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 36, p. 33-44, 2007.

FALCO, A.; FROST, P.; MIEST, J.; PIONNIER, N.; IRNAZAROW, I.; HOOLE, D. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. **Fish & Shellfish Immunol.**, v. 32, n. 6, p. 1051-1057, 2012.

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

GARCIA, F.; MORAES, F. R. D. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Sci. Biol. Sci.**, p. 17-21, 2009.

GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E. M.; DE MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, n. 1-4, p. 39-46, 10/3/ 2007.

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, n.1-4, p.1-15, 2011.

JERÔNIMO, G.T.; LAFFITTE, L.V.; SPECK, G.M.; MARTINS, M.L. Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 71, n. 3, p. 719-725. 2011.

JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (ervacidreira). **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 36-38, 2003.

KELSEY, R.G.; REYNOLDS, G.W.; RODRIGUEZ, E. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In: RODRIGUEZ, E.; HEALEY, P.L.; METHA, I. (Eds.). **Biology and chemistry of plant trichomes**. New York: Plenum, 1984. p.187-241.

KUMAR, V.; ABBAS A. K.; FAUSTO N.; ASTER J. C. Robbins & Cotran. **Patologia Bases Patológicas das Doenças**. 8 ed. São Paulo: Elsevier, 2010.

LIZAMA, M.A.P.; TAKEMOTO, R.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; AYROZA, L.M. PAVANELLI, G.C. Host-parasite relationship of fishes from fish farm in Assis region, São Paulo State, Brazil. 2. *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 29, n. 4, p. 437-445, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 512 p. 2004.

MACHADO, M.; AZEREDO, R.; DÍAZ-ROSALES, P.; AFONSO, A.; PERES, H.; OLIVA-TELES, A.; COSTAS, B. Dietary tryptophan and

methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. **Fish & Shellfish Immunol.**, v. 42, n. 2, p. 353-362, 2015.

MARTINS, M.L. Cuidados Básicos e Alternativas no Tratamento de Enfermidades de Peixes na Aqüicultura Brasileira. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004a. p. 355-368.

MARTINS, M.; ONAKA, E.; TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.; MALHEIROS, E. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. **Rev. Ictiol.**, v. 9, n. 1-2, p. 25-31, 2001.

MARTINS, M.L.; MORAES F.R.; MIYAZAKI D.M.; BRUM C.D.; ONAKA E.M.; FENERICK JR. J.; BOZZO F.R. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) infection in cultivated pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and its haematological effects. **Parasite**, v. 9, n. 2, p. 175-180, 2002.

MARTINS, M. L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T.; FENERICK JR, J.; RIBEIRO, K.; MAKOTO, D.; MYIAZAKI, Y.; DE CASTRO, M. P.; MALHEIROS, E. B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Bol. Inst. Pesca**, 30(1), 71-80. 2004b.

MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M. Y.; MORAES, F. R. D.; GHIRALDELLI, L.; ADAMANTE, W. D. B.; MOURIÑO, J. L. P. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. **Ci. Rur.**, v. 38, p. 213-218, 2008.

MARTINS, M. L.; MYIAZAKI, D. M. Y.; TAVARES-DIAS, M.; FENERICK, J.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; MORAES, F. R. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male × *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). **Braz. J. Biol.**, v. 69, n. 3, p. 957-962, 2009.

MATUSHIMA, E. R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageen in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.

MORAES, J. R. E. D.; BOZZO, F. R.; OZORIO, R. O. A.; ENGRÁCIA FILHO, J. R.; MORAES, F. R. D. Aerocistite aguda induzida por tioglicolato, lipolisacarídeo e *Aeromonas hydrophila* inativada em *Piaractus mesopotamicus*: efeitos hematológicos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 49, n. 5, p. 345-353, 2013.

PARODI, T.V.; CUNHA, M. A.; HELDWEIN, C. G.; SOUZA, D. M.; MARTINS, A. C.; GARCIA, L. O.; WASIELESKY JUNIOR, W.; MONSERRAT, J. M.; SCHIMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B.; BALDISSEROTTO, B. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comp. Biochem. Physiol. (Part C)**, v. 155, p. 462-468, 2012.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHEZ-MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J. Ethnopharmacol.**, v.76, p. 201-214, 2001.

PAVANELLI G.C.; EIRAS J.C.; TAKEMOTO R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá, PR: Eduem, 2008.

PAVANELLI, G.C.; TAKEMOTO, R.M.; EIRAS, J.C. **Parasitologia de Peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Eduem, 2013, 452 p.

REQUE, V. R.; DE MORAES, J. R. E.; DE ANDRADE BELO, M. A.; DE MORAES, F. R. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquaculture**, v. 300, n. 1-4, p. 37-42, 2/27/ 2010.

SACCOL, E.M.H.; UCZAY, J.; PES, 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, p. 244-254, 2013.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n.1-2, p. 63-92, 1999.

SCORVO FILHO, J.D.O agronegócio da aqüicultura: perspectivas e tendências. In: **Zootecnia e o agronegócio**. Brasília, Anais, 2004

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p. 38-43, 2000.

SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: **EDUFSC**, 1999

SOARES B.V.; TAVARES-DIAS M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aqüicultura. *Biota Amazônia* 3, 109-123, 2013.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2011.

TALPUR, A.D.; IKHWANUDDIN, M. Dietary effect of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcifer* (Bloch). **Aquaculture**, v. 364-365, p. 6-12, 2012.

TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M.M.; MARTINS, M.L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S.B.; JERÔNIMO, G.T.; SÁ, A.R.S. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN NETO, A.; MARIANO, W.S.; SÓRIA, S.F.P. (Org.). **Tópicos especiais em saúde e criação animal**. São Carlos, SP: Pedro & João Editores, 2009. pp. 43-80.

TAVARES E.S., JULIÃO L.S., LOPES D., BIZZO H.R., LAGE C.L.S., LEITÃO S.G Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições

semelhantes. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa , v. 15, n. 1, p. 1-5, Mar. 2005

TERBLANCHE, F.C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) - A literature review. **J. Essent. Oil Res.**, v. 8, p. 471-485.

TIZARD, I. Imunidade inata: inflamação. In: **Imunologia Veterinária**. 6ª ed. São Paulo: Roca: 2002. pp. 39-50