

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
CURSO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA

Karolina Victória Rosa

Uso de carvacrol para o controle de enfermidades bacterianas no cultivo do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*)

Florianópolis

2020

Karolina Victória Rosa

**Uso de carvacrol para o controle de enfermidades bacterianas no cultivo do
camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*)**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Engenharia de Aquicultura do Centro de Ciências
agrárias da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a obtenção do título
de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.
Orientador: Prof. Frank Beletini, Dr.
Coorientador: Prof. Felipe do Nascimento Vieira,
Dr.

Florianópolis

2020

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

Rosa, Karolina Victória
Uso de carvacrol para o controle de enfermidades
bacterianas no cultivo do camarão-branco-do-pacífico
(*Litopenaeus vannamei*) / Karolina Victória Rosa ;
orientador, Frank Belettini, coorientador, Felipe do
Nascimento Vieira, 2020.
42 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias, Graduação em Engenharia de Aquicultura,
Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia de Aquicultura. 2. *Litopenaeus vannamei*.
3. Carvacrol. 4. Microbiologia. I. Belettini, Frank . II.
Vieira, Felipe do Nascimento. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Engenharia de Aquicultura. IV.
Título.

Karolina Victória Rosa

Uso de carvacrol para o controle de enfermidades bacterianas no cultivo do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*)

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Engenheiro de Aquicultura” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia de Aquicultura.

Florianópolis, 07 de dezembro de 2020.



Documento assinado digitalmente
Vinicius Ronzani Cerqueira
Data: 04/01/2021 15:05:22-0300
CPF: 234.941.070-68

Prof. Vinicius Ronzani Cerqueira, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



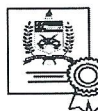
Documento assinado digitalmente
Frank Belettini
Data: 23/12/2020 14:39:02-0300
CPF: 578.726.199-20

Prof.(a) Frank Belettini, Dr.
Orientador

UFSC

Andressa Vieira de Moraes
Avaliadora

Instituto Federal Catarinense



Documento assinado digitalmente
Gabriela Soltes Ferreira
Data: 23/12/2020 12:56:44-0300
CPF: 047.021.579-81

Gabriela Soltes Ferreira, Dra.
Avaliadora
UFSC

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento vai para a equipe do LCM, que me recebeu de braços abertos desde minha primeira fase na faculdade e foram meus companheiros até a última.

Agradeço também aos orientadores e supervisores que tive até aqui: Jatobá, Felipe, Norha, Bruno, Frank e Jaque. Vocês executam a função de vocês com maestria, obrigada por compartilharem comigo todo o conhecimento que possuem e por serem tão solícitos sempre que precisei.

Minha banca avaliadora do TCC não poderia ser outra se não vocês, Gabi e Vieira, mulheres sempre dedicadas, que amam o que fazem e são inspirações pra mim.

Agradeço aos meus colegas de faculdade, especialmente a Letícia, Julia, Angela e Gaby que deixaram essa jornada muito mais leve. Ninguém é feliz sozinho e vocês foram a prova disso nesses anos todos.

Meu muito obrigada aos amigos do grupo Selvagens que sempre foram o equilíbrio da minha vida, sem vocês essa fase não teria sido tão loucamente memorável. Só quem viveu sabe e nós sabemos bem!

Luiz, você deixou meu coração quentinho todas as vezes que eu tive certeza que não daria conta. Obrigada por compartilhar dessa jornada comigo, por ser tão compreensivo e paciente e por fazer eu me sentir a pessoa mais inteligente e poderosa do mundo.

E por último, mas não menos importante, agradeço à minha família que se sacrificou todos os dias desses últimos 5 anos para que eu pudesse realizar esse sonho. Eu aprendi todas as dores e as maravilhas de ter liberdade para fazer as próprias escolhas e graças a vocês, hoje, eu sou uma mulher livre e completamente realizada.

Muito obrigada!

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do carvacrol na inibição de diferentes patógenos que afetam o cultivo de camarões, além de avaliar a influência *in vivo* da ração suplementada com carvacrol sobre os parâmetros zootécnicos e imunológicos do *Litopenaeus vannamei*, e também sobre a microbiota intestinal e a resistência dos camarões ao desafio com *Vibrio parahaemolyticus*. Para isso, foi determinada a atividade inibitória *in vitro* do carvacrol através do método de Disco de difusão em ágar frente a diferentes bactérias, como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Outra análise realizada foi a Concentração mínima inibitória (MIC) do carvacrol frente aos mesmos patógenos. Posteriormente, os camarões foram alimentados por quatro semanas com dietas contendo 1, 3, 4 e 6 mg/mL de carvacrol, além de um grupo controle, sem a adição do carvacrol. Cada tratamento foi realizado em triplicata, em tanques de 400 L povoados com 25 camarões com peso inicial médio de $4,96\text{g} \pm 0,14$. Ao final do experimento foram avaliados parâmetros zootécnicos, imunológicos, microbiota intestinal e resistência dos animais frente a infecção com *V. parahaemolyticus*. Os maiores halos de inibição foram obtidos frente aos patógenos *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* enquanto *V. alginolyticus* e *S. aureus* obtiveram os menores halos da análise. No MIC, o carvacrol conseguiu inibir as bactérias *V. alginolyticus* e *V. harveyi* em uma concentração menor do que as demais bactérias. Ao final do experimento, não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros zootécnicos, imunológicos e nas mortalidades frente a infecção com o *V. parahaemolyticus*. Igualmente, os tratamentos contendo carvacrol não apresentaram diferenças nas contagens de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais quando comparadas com o grupo controle. Pode-se concluir que o carvacrol possui efeito inibitório *in vitro* frente a todos os diferentes patógenos analisados, embora a ração suplementada com o composto não influencie os parâmetros zootécnicos, microbiológicos e imunológicos do *L. vannamei*. Os camarões alimentados com diferentes concentrações de carvacrol também não apresentaram maior resistência frente a infecção com *V. parahaemolyticus*.

Palavras-chave: Carvacrol. *Litopenaeus vannamei*. Concentração mínima inibitória. Contagem microbiológica. Imunologia. Desafio.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the *in vitro* effect of carvacrol on the inhibition of different pathogens that affect shrimp cultivation, in addition to evaluating *in vivo* the influence of the diet supplemented with carvacrol on the zootechnical and immunological parameters of *Litopenaeus vannamei*, and also on the intestinal microbiota and the resistance of shrimp to the challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. For this purpose, the *in vitro* inhibitory activity of carvacrol was determined using the Agar diffusion disk method against different bacteria, such as *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Another analysis carried out was that of minimum inhibitory concentration (MIC) of carvacrol against the same pathogens. Subsequently, the shrimps were fed for four weeks with diets containing 1, 3, 4 and 6 mg/mL of carvacrol, in addition to a control group, without the addition of carvacrol. Each treatment was carried out in triplicate, in 400 L tanks populated with 25 shrimp with an average initial weight of $4.96\text{g} \pm 0.14$. At the end of the experiment, zootechnical and immunological parameters, intestinal microbiota and animal resistance to infection with *V. parahaemolyticus* were evaluated. The highest halos of inhibition were obtained against the pathogens *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* while *V. alginolyticus* and *S. aureus* obtained the smallest halos of the analysis. In MIC, carvacrol was able to inhibit the bacteria *V. alginolyticus* and *V. harveyi* in a lower concentration than the other bacteria. At the end of the experiment, no significant differences were found in the zootechnical and immunological parameters and mortality rates in relation to infection with *V. parahaemolyticus*. Likewise, treatments containing carvacrol showed no difference in *Vibrio* spp. and heterotrophic bacteria when compared to the control group. It can be concluded that carvacrol has an inhibitory effect *in vitro* against all the different pathogens analyzed, although the diet supplemented with the compound doesn't influence the zootechnical, microbiological and immunological parameters of *L. vannamei*. Shrimps fed with different concentrations of carvacrol also didn't show greater resistance to infection with *V. parahaemolyticus*.

Keywords: Carvacrol. *Litopenaeus vannamei*. Minimum inhibitory concentration. Microbiological count. Immunology. Challenge.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Contagem microbiológica de bactérias heterotróficas totais (BHT) e <i>Vibrio</i> spp. do trato intestinal de <i>L. vannamei</i> alimentados com diferentes concentrações de carvacrol e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol.	28
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação da ração utilizada.	17
Tabela 2 – Halos de inibição (mm) formados pela ação do carvacrol frente a diferentes bactérias patogênicas.	22
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (MIC) de carvacrol frente a diferentes bactérias patogênicas.	23
Tabela 4 – Parâmetros zootécnicos de <i>L. vannamei</i> alimentados com diferentes concentrações de carvacrol e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol.	25
Tabela 5 – Parâmetros imunológicos de <i>L. vannamei</i> alimentados com diferentes concentrações de carvacrol e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol.	26
Tabela 6 – Mortalidade cumulativa de <i>L. vannamei</i> alimentados com diferentes concentrações de carvacrol e uma dieta controle, sem adição de carvacrol, após o desafio com o <i>V. parahaemolyticus</i>	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	13
1.1.1	Objetivo Geral.....	13
1.1.2	Objetivos Específicos	13
2	MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1	COMPOSTO BIOATIVO	15
2.2	BACTÉRIAS PATOGÊNICAS	15
2.3	EFEITOS <i>IN VITRO</i> DO CARVACROL FRENTE AOS DIFERENTES PATÓGENOS	15
2.3.1	Análise por Disco de difusão em ágar	15
2.3.2	Concentração mínima inibitória	16
2.4	MATERIAL BIOLÓGICO.....	17
2.5	EFEITOS <i>IN VIVO</i> DO CARVACROL NO CAMARÃO.....	17
2.5.1	Dietas experimentais.....	17
2.5.2	Condições experimentais.....	18
2.5.3	Análise imunológica e da microbiota do trato intestinal.....	19
2.5.4	Desafio experimental com <i>V. parahaemolyticus</i>	20
2.5.5	Desempenho zootécnico.....	20
2.5.6	Análises estatísticas.....	21
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
3.1	EFEITOS <i>IN VITRO</i> DO CARVACROL CONTRA DIFERENTES PATÓGENOS	21
3.1.1	Análise por Disco de difusão em ágar	21
3.1.2	Análise da concentração inibitória mínima (MIC).....	23
3.2	EFEITOS <i>IN VIVO</i> DO CARVACROL NO CAMARÃO.....	24
3.2.1	Qualidade de água	24
3.2.2	Desempenho zootécnico.....	25

3.2.3	Análise imunológica e da microbiota do trato intestinal.....	26
3.2.4	Desafio frente ao <i>Vibrio parahaemolyticus</i>.....	29
4	CONCLUSÃO.....	31
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos setores de produção de alimentos que mais cresceu no mundo, sendo que em 2018 produziu mais de 82 milhões de toneladas de pescado e gerou um volume de 250 bilhões de dólares, chegando próximo da pesca que captou pouco mais de 96 milhões de toneladas (FAO, 2020).

O cultivo de camarão marinho, principalmente da espécie *Litopenaeus vannamei*, impulsionou a aquicultura no Brasil, alcançando uma produção de aproximadamente 60 mil toneladas em 2016, sendo 7,4% maior em relação ao ano anterior (IBGE, 2016). Porém, em 2017, ocorreu uma queda dessa produção, atingindo apenas 53 mil toneladas (FAO, 2018). Uma das principais causas desse déficit na produção é o surgimento de enfermidades bacterianas que podem causar mortalidade dos animais e até a perda total da produção, dificultando assim o crescimento da atividade no país (DE NEGREIROS; SANTOS, 2015).

Dentre os efeitos negativos que as infecções provocadas por bactérias podem causar, estão sintomas como anorexia, inatividade, a baixa taxa de crescimento, necrose do músculo, e, conseqüentemente, mortalidades (LAFFERTY et al., 2015). Entre essas doenças, as vibrioses (causadas por bactérias do gênero *Vibrio*) vem ganhando destaque. Estas bactérias são caracterizadas por serem bacilos flagelados e Gram-negativos, que estão presentes na água e no sedimento do viveiro e podem se aderir ao trato intestinal dos crustáceos. Além disso, esses microrganismos sobrevivem e se reproduzem em águas com alta salinidade e temperaturas entre 10 a 30°C (MANJUSHA et al., 2005; MURRAY et al., 2017).

A nível mundial, um exemplo de vibriose é a Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND, do inglês *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*) que teve seu primeiro relato em 2009, na China (LIGHTNER et al., 2012). No entanto, apenas em 2013 descobriu-se que o agente etiológico dessa enfermidade era o *Vibrio parahaemolyticus* (FAO, 2013). Altamente patogênica, essa bactéria atinge principalmente as fases de camarões mais jovens, liberando toxinas que causam disfunções no hepatopâncreas e em consequência podem levar a mortalidades (TRAN et al., 2013). A AHPND, atualmente, tem sido a doença bacteriana que mais afeta os camarões cultivados, causando grandes perdas econômicas (CHUMPOL et al., 2016).

Para tratar as vibrioses, comumente são utilizados antibióticos (FLORES-MIRANDA et al., 2011; WONGTAVATCHAI et al., 2010; WEN et al., 2014). Porém, além de ser uma alternativa de alto custo, o uso indiscriminado deste quimioterápico é extremamente

prejudicial, pois pode gerar a seleção de bactérias resistentes, deixar resíduos nos alimentos e no meio ambiente e ainda afetar negativamente a saúde dos consumidores (DEFOIRDT et al., 2011; CHAKRABORTY et al., 2011).

Com isso, para que a carcinicultura continue se desenvolvendo sem o impacto causado pelas enfermidades, faz-se necessário o uso de meios alternativos que não gerem resistência bacteriana e que reduzam os impactos ambientais. Entre eles, temos os probióticos, sais orgânicos, compostos bioativos, extratos de plantas e óleos essenciais (REGO et al., 2012; CORRÊA et al., 2018; CORONEL, 2016).

Os óleos essenciais são utilizados há muito tempo na indústria farmacêutica e de cosméticos e recentemente vêm sendo utilizados como antimicrobianos em diversas áreas (HERNANDES et al., 2017). Sua ação se dá devido aos princípios ativos contidos nas plantas como terpenóides, alcalóides, taninos e fenóis. Este último, possui característica hidrofóbica e atua rompendo a parede celular microbiana, fazendo com que perca sua funcionalidade (FORSYTHE, 2013; MORO et al., 2015). Dentre os fenóis, um comumente utilizado é o carvacrol, sendo um monoterpene fenol (2-metil- 5-(1-metiletil) fenol) aprovado pelo FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) para uso alimentar e foi incluído pelo Conselho da Europa na lista de aromas químicos, categoria B, que pode ser adicionado aos alimentos (FDA, 2017).

Muitos óleos essenciais contendo carvacrol têm demonstrado eficiência contra diferentes patógenos e com isso, estudos que avaliam essa efetividade vêm sendo realizados com diferentes plantas, como os óleos extraídos do alecrim (*Salvia rosmarinus*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e orégano (*Origanum vulgare*) (BASSANETTI et al., 2017; PESAVENTO et al., 2015).

O óleo essencial extraído do orégano (*Origanium vulgaris*) possui o carvacrol como componente majoritário e este é o principal responsável pela ação antimicrobiana do óleo, não só contra bactérias, mas também contra fungos e leveduras (LIOLIOS et al., 2009). Além disso, o composto fenólico tem ação contra bactérias Gram-positivas onde atua principalmente na membrana plasmática e contra Gram-negativas, onde atua na desintegração da membrana externa destes microrganismos, liberando os lipopolissacarídeos da parede celular (GURSOY et al., 2009; LA STORIA et al., 2011). Além do efeito antimicrobiano, o carvacrol possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticarcinogênicas, antimutagênicas, antigenotóxicas e hepatoprotetoras (CIANDRINI et al., 2014).

Nos últimos anos, vários estudos e relatórios vem sendo realizados na indústria alimentícia para comprovar a eficiência do carvacrol como antimicrobiano. Altan et al. (2018) demonstraram que incluir o composto nas fibras de embalagens possibilita um aumento da vida útil dos alimentos carregados e armazenados por estas, como pães e frutas. Constatou-se também que a inclusão do carvacrol na forma de emulsão permite uma ampliação do tempo de prateleira de alimentos frescos como carne de frango e de peixe, pois retarda a deterioração causada por microrganismos (KARAM et al., 2019; SYED et al., 2020; ALVES et al., 2018). Alguns trabalhos anteriores comprovaram que a incorporação do carvacrol na dieta de diferentes espécies como aves e peixes exerce um efeito benéfico em múltiplos parâmetros na criação destes animais (AHMADIFAR et al., 2011; HASHEMIPOUR et al., 2013).

Devido a relevância da carcinicultura para a aquicultura brasileira, estudos que busquem alternativas para reduzir os impactos das enfermidades bacterianas, além de evitar a seleção de cepas resistentes e o acúmulo de resíduos quimioterápicos nos animais e ambiente é de extrema importância para o setor. Assim, a utilização de óleos essenciais e seus compostos bioativos como o carvacrol, na qual é conhecido por suas propriedades antimicrobianas, pode representar uma alternativa que visa capacitar os animais a responder de forma mais eficiente aos agentes patogênicos presentes no cultivo. Além disso, estudos que abordam a eficácia desse tipo de suplementação em camarões ainda são escassos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso do carvacrol como agente antimicrobiano no cultivo de *L. vannamei*.

1.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar *in vitro* o efeito do carvacrol na inibição de diferentes patógenos que afetam o cultivo de camarões.

Avaliar a influência da ração suplementada com carvacrol sobre os parâmetros zootécnicos e imunológicos do *L. vannamei*.

Avaliar a influência da ração suplementada com carvacrol sobre a microbiota intestinal e a resistência dos camarões ao desafio com *Vibrio parahaemolyticus*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em um período de 4 semanas no mês de novembro de 2019.

2.1 COMPOSTO BIOATIVO

O carvacrol utilizado foi extraído do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare*) e doado pelo Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da UFSC na concentração de 10 mg/mL. O composto bioativo foi disponibilizado na sua forma protegida por nanoemulsão, previamente preparado por emulsificação com Tween® 80 (1:1), armazenado em frasco âmbar e mantido a temperatura ambiente.

2.2 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Os patógenos testados *in vitro* foram: *Vibrio alginolyticus* BCCM 2068, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 e *Vibrio harveyi* ATCC 14126, como patógenos com importância na aquicultura, e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25102 como patógenos padrões Gram-positivo e Gram-negativo, respectivamente.

O patógeno escolhido para o desafio foi o *V. parahaemolyticus* devido seu grande impacto nos cultivos de camarões.

2.3 EFEITOS *IN VITRO* DO CARVACROL FRENTE AOS DIFERENTES PATÓGENOS

2.3.1 Análise por Disco de difusão em ágar

A inibição do carvacrol pelo método de disco de difusão em ágar foi avaliado frente aos microrganismos descritos no item 2.2. Para isso, os patógenos foram previamente inoculados em caldo BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) com 3% de NaCl para *V.*

alginoliticus, *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi*. Para as demais bactérias, foi utilizado caldo BHI 0% e ambos incubados por 24 horas à 30°C. Em seguida, as suspensões bacterianas foram diluídas em solução salina (3% e 0%) e 100 µl de cada patógeno, em uma concentração de aproximadamente 1×10^6 UFC mL⁻¹ foram semeados em placas contendo meio de cultura TSA (do inglês, *Agar Tryptic Soy*). Posteriormente, o ágar foi perfurado formando três poços de 0,8 milímetros (mm) de diâmetro nos quais foram adicionados 50 µl de carvacrol, sendo que cada amostra foi realizada em triplicata. As placas foram incubadas à 30°C e após 24 horas os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor de cada poço foram mensurados em mm. Esta metodologia foi realizada de acordo com o NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2006) com algumas modificações.

2.3.2 Concentração mínima inibitória

A metodologia da concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) do carvacrol foi avaliada frente aos microrganismos descritos no item 2.2. Para isso, os patógenos foram previamente inoculados em caldo BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) com 3% de NaCl para *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi*. Para as demais bactérias, foi utilizado caldo BHI 0% e ambos incubados por 24 horas à 30°C. Em seguida as suspensões bacterianas foram centrifugadas (15 minutos a 1.800 *xg*) e diluídas em solução salina (0 e 3%) até obtenção da concentração 0,5 na escala de Mac Farland, o que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Posteriormente, utilizando microplacas de 96 poços com fundo em “U”, foram adicionados 100 µL de meio de cultura, sendo PWS (do inglês, *Salt peptone water*- 1% de peptona, 3% de NaCl, pH 7.4) utilizado para *Vibrios* e PB (do inglês, *Poor Broth* - 1% de peptona, 0,5% de NaCl, pH 7.4) para *E. coli* e *S. aureus*. Em seguida, foi adicionado 100 µL de carvacrol no primeiro poço e após realizada uma diluição seriada até o 12º poço. Finalmente, foram adicionados em todos os poços 20µL da bactéria patogênica na concentração de 0,5 na escala de Mac Farland. Os testes foram realizados para cada bactéria patogênica em triplicata. Para os controles foram utilizados somente os meios de cultura com os patógenos (controle positivo) e sem os patógenos (controle negativo). As microplacas foram incubadas à 30° por 24 horas e o crescimento dos microrganismos foi determinado através do método colorimétrico, no qual foi adicionado 30 µL da solução de resazurina sódica (0,01%, Sigma) e após 1 hora foi realizado a leitura dos resultados, considerando a concentração imediata ao aparecimento da

cor. A coloração azul demonstra a inatividade bacteriana e a rosa a atividade bacteriana (ARAUJO et al., 2016).

2.4 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizados juvenis de camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) com peso médio de $4,96 \pm 0,14$ g cultivados no LCM. A linhagem antecessora destes indivíduos é livre de patógenos específicos (SPF – *Specific Pathogen Free*) de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Epizootias (OIE).

2.5 EFEITOS *IN VIVO* DO CARVACROL NO CAMARÃO

2.5.1 Dietas experimentais

A ração utilizada foi fabricada no Laboratório de Nutrição Animal (LABNUTRI). As dietas utilizadas foram formuladas com o software Optimal Fórmula 2000[®] atendendo as exigências nutricionais da espécie (GONG et al., 2000; NRC, 2011; ZHOU et al., 2012). Para o experimento *in vivo* (item 2.5) foi testada uma dieta Controle (sem carvacrol) e as outras dietas, contendo os mesmos ingredientes, foram acrescidas com diferentes concentrações de carvacrol, sendo 1, 3, 4 e 6 mg/mL. O carvacrol foi adicionado por aspensão utilizando micropipeta no momento de cada alimentação e as suas concentrações foram definidas de acordo com os resultados obtidos nas análises *in vitro* do presente estudo. Os ingredientes utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Formulação da ração utilizada.

Ingredientes	g kg⁻¹
Farinha de trigo	150
Farelo de soja	324,63
Carboximetilcelulose	5
Lecitina de soja	25
Fosfato monocálcico	25
Óleo de soja	10
Vitamina C	0,7

Premix vitamínico ¹	
Premix mineral ²	
Sulfato de magnésio	15
Caulim	100
Cloreto de sódio	12
Cloreto de potássio	10
Metionina	5
Resíduo de peixe	150
Farinha de vísceras	125,67
Óleo de peixe	20
Carvacrol ³	
Composição centesimal	
	%
Umidade	9,04
Proteína bruta	36,6
Extrato etéreo	8,71
Fibra bruta	1,87
Cinzas	17,65

Premix vitamínico¹: vit. A - 900 mg kg⁻¹; vit. D3 - 25 mg kg⁻¹; vit. E - 46.900 mg kg⁻¹; vit. K3 - 1.400 mg kg⁻¹; cobalamina (B12) - 50 mg kg⁻¹; piridoxina (B6) - 33.000 mg kg⁻¹; riboflavina - 20.000 mg kg⁻¹; ácido nicotínico - 70.000 mg kg⁻¹; ácido pantotênico - 40.000 mg kg⁻¹; biotina - 750 mg kg⁻¹; ácido fólico - 3.000 mg kg⁻¹;

Premix mineral²: cobre - 2.330 mg kg⁻¹; zinco - 10.000 mg kg⁻¹; manganês - 6.500 mg kg⁻¹; selênio - 125 mg kg⁻¹; iodo - 1.000 mg kg⁻¹; cobalto - 50 mg kg⁻¹; magnésio - 20 g kg⁻¹; potássio - 6,1 g kg⁻¹. DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, SP, Brasil).

Carvacrol³: O carvacrol foi pipetado a cada alimentação obedecendo as concentrações definidas para os tratamentos (1, 3, 4 e 6 mg/mL).

2.5.2 Condições experimentais

O experimento avaliou o efeito *in vivo* do carvacrol no camarão *L. vannamei* mantidos em água clara. As dietas descritas no item 2.5.1 foram testadas em tanques de polietileno, com volume útil de 400 L e equipados com um sistema de aeração e aquecedores individuais. Cada tratamento foi realizado em triplicata, totalizando 15 tanques experimentais povoados com 25 animais em delineamento inteiramente ao acaso. Durante todo o experimento, a água dos tanques foi renovada em dias alternados até a total retirada de sólidos suspensos como restos de alimento, fezes e mudas.

As alimentações foram administradas no início e final da manhã e da tarde, totalizando quatro alimentações ao dia, que foram ajustadas de acordo com biometrias quinzenais e a sobrevivência, seguindo uma conversão programada estimada (RAY et al., 2010). Além disso, foram aferidos os parâmetros de qualidade de água, como oxigênio dissolvido e temperatura

uma vez ao dia (YSI 55, YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, EUA). Uma vez por semana foram realizadas análises de pH, salinidade (YSI 55, YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, EUA), alcalinidade, amônia total e nitrito, seguindo os protocolos padrões do LCM.

2.5.3 Análise imunológica e da microbiota do trato intestinal

Após os 30 dias de alimentação foi coletada hemolinfa de dez camarões por tanque (três *pool* por tratamento) para análises dos parâmetros imunológicos como contagem total de hemócitos (THC), concentração de proteína na hemolinfa, atividade da fenoloxidase (PO) e título aglutinante do soro.

A hemolinfa foi obtida do *sinus* ventral e foi coletada com seringas estéreis de 1 mL com agulha 21G resfriadas a 4°C. A partir da hemolinfa coletada, 50 uL foram fixados em solução anticoagulante Alsever modificado (MAS, do inglês *Modified Alsever Solution* - citrato de sódio 27 mM, EDTA 9 mM, glicose 115 mM, NaCl 336 mM, pH 7.2) com 4% de formaldeído para contagem total de hemócitos (THC). O restante foi coagulado a 4°C, macerado e centrifugado a 6.000 $\times g$ por 10 minutos para obtenção do soro, no qual foi aliquoteado e estocado a -20 °C. O número de hemócitos por mililitro de hemolinfa foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer. A concentração total da proteína do soro foi realizada em microplacas de 96 poços (fundo chato) e estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina como padrão. Este e os próximos ensaios foram realizados em triplicatas. A atividade da enzima fenoloxidase (PO) foi determinada por espectrofotometria (490 nm) pela formação do pigmento DOPA-cromo, após a oxidação do substrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). As amostras do soro foram diluídas (1:15) em TBS-1 (Tris 1 mM, NaCl 336 mM, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.6). Desta solução, 50 uL foram incubados em um volume igual de tripsina (Sigma, 1 mg mL⁻¹) indutor enzimático, em microplacas de 96 poços (fundo chato) por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 50 µL de L-DOPA (Sigma, 3 mg mL⁻¹) em todos os poços. Nos controles, a tripsina foi substituída por TBS e a formação do DOPA-cromo foi monitorada após 5, 10 e 15 minutos. A atividade da PO foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na absorbância/minuto/miligrama de proteína (SÖDERHÄLL et al., 1984). Para a análise da capacidade aglutinante do soro, inicialmente foram depositados 50 µL da solução TBS-2 (Tris 50 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) em todos os poços da microplaca de fundo em “U”. Em seguida, foi

adicionado no primeiro poço o soro diluído (1:15) em TBS-2 e realizado as diluições seriadas até o 12º poço. Ao final, 50 µL da solução de eritrócitos caninos a 2% foram adicionados em cada poço, misturados e incubados por 2 horas em câmara úmida e a temperatura ambiente. Nos poços controle, o soro dos camarões foi substituído por TBS-2. O título aglutinante foi definido como o recíproco da última diluição capaz de aglutinar os eritrócitos, de acordo com (MAGGIONI et al., 2004).

A partir dos mesmos camarões utilizados para os testes imunológicos descritos acima, os intestinos dos dez camarões foram assepticamente extraídos, homogeneizados em um gral e diluídos serialmente (1/10) em solução salina estéril 3%. Posteriormente, foram semeados em meio de cultura TSA e TCBS (do inglês, *Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar*), ambos com 3% de NaCl, para contagem de bactérias heterotróficas totais e *Vibrio* spp. totais, respectivamente. Os intestinos semeados nas placas foram incubados em estufa a 30°C, por 24 horas e posteriormente foi realizada as contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC).

2.5.4 Desafio experimental com *V. parahaemolyticus*

Ao final do experimento, 10 camarões de cada tanque (totalizando 30 por tratamento) foram transferidos para o Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAQ) onde foram distribuídos em tanques de 100L de água com aeração e aquecimento controlados. Pela parte dorsal do primeiro segmento abdominal dos camarões foram injetados com 100 µL de solução de *V. parahaemolyticus* em uma concentração de 1×10^7 UFC/mL segundo teste DL50 realizado previamente. Os animais foram monitorados por 48 horas e após esse período foi avaliado a mortalidade.

2.5.5 Desempenho zootécnico

Ao final do experimento foi realizado a biometria final de todos os camarões cultivados em cada unidade experimental para obtenção dos parâmetros zootécnicos, conforme indicado abaixo:

- a) Ganho de peso total

$$\text{Ganho de peso total (g)} = Pf - Pi$$

Onde, Pf – peso final (g) e Pi – peso inicial (g).

b) Sobrevivência

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \frac{Nf}{Ni} \cdot 100$$

Onde, Nf – n° final de animais e Ni – n° inicial de animais.

c) FCA

$$FCA = \frac{QR}{Bf - Bi}$$

Onde, QR – quantidade total de ração fornecida (g), Bf – biomassa final (g) e Bi – biomassa inicial (g).

Além destes, também foi avaliado individualmente o peso final de cada tratamento.

2.5.6 Análises estatísticas

A homocedasticidade e normalidade de todos os dados foram avaliados através do Teste de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Quando considerados paramétricos, estes dados foram analisados por meio de Análise de variância unifatorial (ANOVA - *one way*), seguido pelo teste de Tukey. Quando considerados não paramétricos, os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Para a contagem de bactérias do trato intestinal os dados foram transformados para $\log^{10}(x + 1)$, e os de título aglutinante foram transformados em $\log^2(x + 1)$ antes de serem submetidos a análise estatística. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa Statistica 13.5 (StatSoft®), utilizando o nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITOS *IN VITRO* DO CARVACROL CONTRA DIFERENTES PATÓGENOS

3.1.1 Análise por Disco de difusão em ágar

Os resultados do disco de difusão em ágar do carvacrol frente aos diferentes microrganismos estão descritos na Tabela 2. A análise apresentou diferenças estatísticas, onde os maiores halos de inibição foram obtidos frente aos patógenos *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* com $13,75 \pm 0,12$ e $12,92 \pm 0,82$ mm, respectivamente. Enquanto a *E. coli* apresentou um halo de $9,92 \pm 2,0$ mm, os patógenos *V. alginolyticus* e *S. aureus* obtiveram os menores halos da análise, com $9,63 \pm 0,18$ e $9,17 \pm 0,47$ mm, respectivamente.

Tabela 2. Halos de inibição (mm) formados pela ação do carvacrol frente a diferentes bactérias patogênicas.

Patógenos (1×10^6 UFC mL ⁻¹)	Médias (mm)
<i>V. alginolyticus</i>	$9,63 \pm 0,18^b$
<i>V. harveyi</i>	$12,92 \pm 0,82^a$
<i>V. parahaemolyticus</i>	$13,75 \pm 0,12^a$
<i>S. aureus</i>	$9,17 \pm 0,47^b$
<i>E. coli</i>	$9,92 \pm 2,0^{ab}$

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão em triplicatas. As diferenças estatísticas estão indicadas por letras diferentes. $p = 0,0028$.

O carvacrol possui forte atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias. Isso já foi demonstrado no estudo feito por Dorman e Deans (2000), que testaram o efeito do carvacrol através do método de disco de difusão sobre 25 bactérias, sendo que destas, 16 eram Gram-negativas, 9 Gram-positivas e todas apresentaram sensibilidade ao composto. Sotelo-Boyás et al. (2017) constataram que o óleo essencial de tomilho nanoparticulado, tendo como principais compostos o carvacrol e o timol, possui ação antimicrobiana sobre as 6 bactérias testadas, entre elas a *E. coli* e *S. aureus*. Esta última, apresentou um halo de inibição de 43 mm demonstrando ser, entre as testadas, a bactéria mais sensível ao óleo.

O resultado do presente estudo está de acordo com Gracia-valenzuela et al. (2014) que mostraram que o óleo essencial de orégano contendo 40% de carvacrol e 25% de timol possui atividade antimicrobiana frente ao *V. vulnificus*, *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, todas Gram-negativas. Isso acontece pois o carvacrol é hidrofóbico e pode obter acesso ao periplasma de bactérias Gram-negativas através das proteínas porinas da membrana externa, desestabilizando-a (Helander et al., 1998).

Snoussi et al. (2008) também mostraram através da metodologia de disco de difusão em ágar que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* contendo 60,27% de carvacrol é mais efetivo contra o *V. parahaemolyticus* do que contra o *V. alginolyticus*, resultado este que está de acordo com o do presente estudo. Os diâmetros dos halos mensurados no estudo mencionado foram de 14,66 e 13,33 mm, respectivamente.

La Storia et al. (2011) testaram o poder de inibição do carvacrol em diferentes concentrações (1,3; 3,3 e 6,6 mM) sobre 8 bactérias Gram-positivas e negativas, incluindo a *E. coli*. Através do método de disco difusão em ágar, todas as bactérias apresentaram halos de inibição, sendo que na maior concentração de carvacrol todas as bactérias foram completamente erradicadas.

3.1.2 Análise da concentração inibitória mínima (MIC)

Os resultados da concentração inibitória mínima do carvacrol frente a diferentes microrganismos estão descritos na Tabela 3. O carvacrol inibiu o *V. alginolyticus* e *V. harveyi* em uma concentração menor que as demais bactérias. Enquanto estes apresentaram concentrações de 0,078 mg/mL, os demais microrganismos somente foram inibidos pelo carvacrol na concentração de 0,156 mg/mL.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (MIC) de carvacrol frente a diferentes bactérias patogênicas.

Patógenos	Concentração de carvacrol (mg/mL)
<i>V. alginolyticus</i>	0,078 ± 0,00
<i>V. harveyi</i>	0,078 ± 0,00
<i>V. parahaemolyticus</i>	0,156 ± 0,00
<i>S. aureus</i>	0,156 ± 0,00
<i>E. coli</i>	0,156 ± 0,00

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão de triplicatas. $p < 0,05$.

Veldhuizen et al. (2006) demonstraram que o carvacrol possui atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas Gram-negativas como a *E. coli* e Gram-positivas como a *S. aureus*, com valores de MIC de 0,018 e 0,025 mg/mL, respectivamente. Outro estudo feito por Helander et al. (1998) mostrou que o carvacrol apresenta efeito inibitório

sobre a *E. coli*, com uma concentração inibitória mínima de 0,045 mg/mL, causando danos à membrana bacteriana.

Segundo Vasconcelos et al. (2017), o óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* contendo 88,17% de carvacrol, bem como o carvacrol isolado causaram uma inibição em todas as 35 cepas de *S. aureus* testadas com um valor de MIC de 0,25 mg/mL para todas. Já Chen et al. (2009) encontraram valores maiores de concentração mínima inibitória de carvacrol frente à *S. aureus* e *E. coli* (0,45 mg/mL e 0,225 mg/mL, respectivamente). Guarda et al. (2011) encontraram o mesmo valor de 0,225 mg/mL para *S. aureus* e 0,375 mg/mL para *E. coli* utilizando o carvacrol na análise.

O resultado do presente estudo está de acordo com Snoussi et al. (2008) que encontraram os mesmos valores de MIC para *V. alginolyticus* (0,078 mg/mL) e para *V. parahaemolyticus* (0,156 mg/mL) quando testaram o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) contendo 60% de carvacrol.

Um resultado similar de MIC foi encontrado por Fang et al. (2019) que chegaram à uma concentração mínima de 0,125 mg/mL de carvacrol para inibir a bactéria *S. aureus*. Outro resultado similar foi o encontrado por Gracia-valenzuela et al. (2014), onde foi testado o óleo essencial de orégano contendo 40% de carvacrol e 25% de timol e foi demonstrado que este produto à uma concentração mínima inibitória de 0,05 mg/mL é capaz de inibir bactérias do gênero *Vibrio* como o *V. alginolyticus*.

3.2 EFEITOS *IN VIVO* DO CARVACROL NO CAMARÃO

3.2.1 Qualidade de água

Nenhum dos parâmetros de qualidade de água apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). A temperatura se manteve em $28,73 \pm 0,75$ °C (média \pm desvio padrão) e a concentração de oxigênio dissolvido em $5,64 \pm 0,40$ mg mL⁻¹. Além destes, a salinidade foi mantida em $34,31 \pm 0,49$ g/L, o pH em $8,15 \pm 0,04$ e a alcalinidade foi de $121,15 \pm 15,17$ mg CaCO₃/L. A concentração de amônia N-NH₃ se manteve em de $0,91 \pm 0,26$ mg mL⁻¹ e a concentração do nitrito N-NO₂ em $0,39 \pm 0,26$ mg mL⁻¹. Todos os parâmetros encontrados estão dentro dos limites considerados adequados para o crescimento *L. vannamei* (VAN WYK; SCARPA; 1999; MC GINTY; RAKOCY, 2003; VINATEA, 2004).

3.2.2 Desempenho zootécnico

Ao final do experimento, a sobrevivência foi alta (acima de 99%), no entanto, não foi observada nenhuma diferença significativa, bem como nos demais parâmetros analisados como peso final, ganho de peso total e fator de conversão alimentar (FCA), conforme descritos na Tabela 4. Apesar disso, os animais do tratamento com 3 mg/mL de carvacrol apresentarem peso final e ganho de peso total um pouco maiores em relação aos demais tratamentos.

Tabela 4. Parâmetros zootécnicos de *L. vannamei* alimentados com diferentes concentrações de carvacrol e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol.

Tratamentos	Peso final (g)	Ganho de peso total (g)	Sobrevivência (%)	FCA
Controle	11,87 ± 0,02	6,74 ± 0,10	100 ± 0,00	1,40 ± 0,02
1 mg/mL	11,83 ± 0,32	6,79 ± 0,28	100 ± 0,00	1,33 ± 0,07
3 mg/mL	12,14 ± 0,59	7,22 ± 0,60	99 ± 2,31	1,37 ± 0,09
4 mg/mL	11,83 ± 0,38	6,86 ± 0,33	99 ± 2,41	1,45 ± 0,07
5 mg/mL	11,25 ± 0,28	6,45 ± 0,34	100 ± 0,00	1,43 ± 0,03

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão das triplicatas. $p > 0,05$.

A alimentação é um dos pontos mais críticos da aquicultura, pois a ração geralmente representa a maior despesa (cerca de 50%) para uma empresa (CARDENAS et al., 2015). Portanto, estudos que buscam melhorar o aproveitamento dessa ração vem sendo cada vez mais desenvolvidos, como o feito por Ahmadifar et al. (2011) onde foi demonstrado que a adição de 2 e 3 g/kg de carvacrol e timol na dieta da Truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) proporciona maior peso, comprimento e ganho de peso final dos animais quando comparada aos peixes alimentados com dietas contendo menores concentrações dos compostos e também ao grupo controle. Além disso, neste mesmo estudo, a taxa de conversão alimentar foi melhor nos animais alimentados com as dietas contendo diferentes concentrações de carvacrol e timol em comparação ao grupo controle.

O potencial dos óleos essenciais para controlar a carga bacteriana em cultivos já foi demonstrado por alguns autores, como Randrianarivelo et al. (2010), que comprovou a redução da carga bacteriana e conseqüente aumento da sobrevivência de larvas do camarão da

espécie *Penaeus monodon* com o uso do óleo essencial de *Cinnamosma fragrans* na água do cultivo.

Um estudo realizado por Ferreira et al. (2014), avaliou o desempenho produtivo de juvenis de Lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações do óleo essencial de orégano contendo 63% de carvacrol e foi demonstrado que em uma concentração de 0,5 g/kg o óleo atua como um promotor de crescimento para espécie.

O resultado deste estudo está de acordo com o encontrado por He et al. (2017) que não encontraram diferenças significativas tanto no crescimento como na sobrevivência de *L. vannamei* alimentados com a adição de um blend de óleos essenciais na dieta, quando comparada com o grupo controle.

Zheng et al. (2009) também não encontraram diferença significativa na sobrevivência do bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) alimentado com a adição de carvacrol, timol, e a junção dos dois compostos entre as dietas e o grupo controle. Porém, neste mesmo estudo, o ganho de peso total dos animais foi significativamente maior nos animais alimentados com o carvacrol e o timol quando comparados ao grupo controle.

Em um estudo feito com larvas de jundiá (*Rhamdia* sp.) alimentados com a adição do óleo essencial do orégano também não se obteve diferença nos parâmetros zootécnicos entre as dietas e o grupo controle (OLIVEIRA et al., 2009). O mesmo ocorreu com Volpatti et al. (2012) quando testaram a adição de duas concentrações de carvacrol (0,025 e 0,05%) na dieta do robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*).

3.2.3 Análise imunológica e da microbiota do trato intestinal

Após quatro semanas nenhum dos parâmetros imunológicos analisados como a contagem total de hemócitos (THC), proteína do soro, atividade da enzima fenoloxidase (PO) e título aglutinante do soro apresentaram diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$), conforme demonstrado na Tabela 5. Apesar disso, na contagem total de hemócitos, o tratamento com 4mg/mL de carvacrol em nanoemulsão obteve uma contagem maior do que os demais tratamentos e do grupo controle.

Tabela 5. Parâmetros imunológicos de *L. vannamei* alimentados com diferentes concentrações de carvacrol e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol.

Tratamentos	THC (x10 ⁶)	Proteína do soro (mg mL ⁻¹)	Atividade PO (U)	Título aglutinante do soro (log ₂)
Controle	51,29 ± 0,63	212,13 ± 0,43	11,06 ± 1,77	9,33 ± 0,58
1 mg/mL	24,95 ± 0,80	213,76 ± 3,55	5,20 ± 2,85	10,05 ± 0,84
3 mg/mL	56,03 ± 0,20	212,08 ± 0,46	8,15 ± 4,96	9,81 ± 0,34
4 mg/mL	77,97 ± 0,16	214,26 ± 4,57	7,13 ± 2,56	9,25 ± 0,67
6 mg/mL	41,44 ± 0,66	213,72 ± 1,50	7,27 ± 2,02	10,00 ± 0,00

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão das triplicatas. $p > 0,05$.

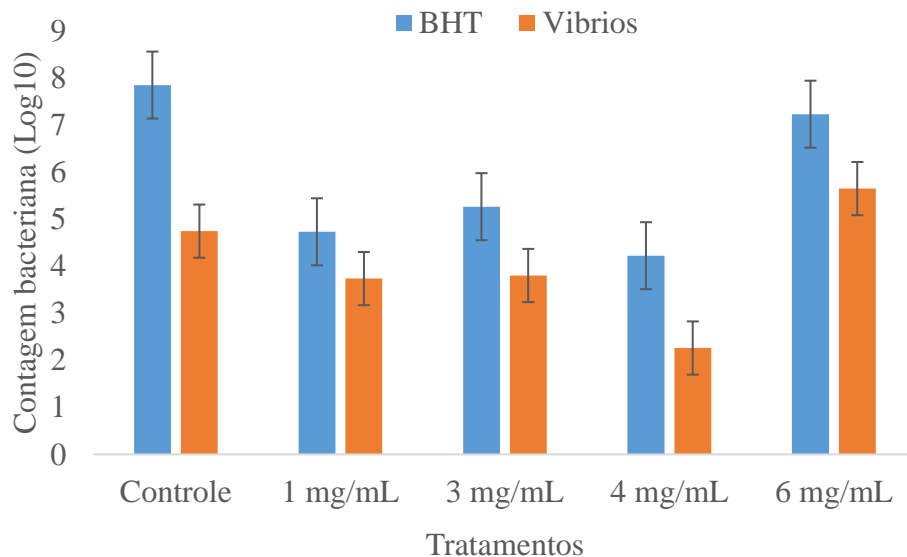
Diferentes estudos relatam que o uso de alguns óleos essenciais como o de zingerona é capaz de melhorar o sistema imunológico do camarão *L. vannamei* aumentando a atividade da PO (CHANG et al., 2012). Além deste, o óleo essencial de *Cinnamomum kanehirae* também melhorou a eficácia da ativação da fenoloxidase do *L. vannamei* (YEH et al, 2009). Essa ativação do sistema da fenoloxidase é considerada uma das principais respostas imunofetoras dos crustáceos (CERENIUS et al., 2004; BARRACCO et al., 2008).

Outra análise imunológica é a contagem de hemócitos que pode variar entre as espécies de crustáceos e é conhecida por ser afetada por vários fatores, como infecção e estresse ambiental (SMITH et al., 1992). No estudo feito por Rajasekar et al. (2011), a contagem total de hemócitos de camarões da espécie *Penaeus monodon* foi maior no grupo de animais alimentados com a adição de diferentes porcentagens do extrato da planta *Cardiospermum halicacubum*, quando comparado com o grupo controle que recebeu apenas uma dieta basal.

Os resultados encontrados nesse estudo estão de acordo com o estudo feito por Tomazelli-Júnior et al. (2017) com *L. vannamei*, onde as contagens de título aglutinante do soro também não apresentaram diferenças entre os tratamentos que continham óleo essencial de tomilho, composto em sua maioria por carvacrol e timol, e o grupo controle após infecção com o vírus WSSV. O mesmo estudo demonstrou que a adição de 1% do óleo essencial melhorou a atividade de fenoloxidase dos animais infectados. Já no estudo feito com alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) demonstrou-se uma melhora em todos os parâmetros imunológicos testados, incentivando a resposta imune dos animais através de uma dieta suplementada com timol (AMER et al., 2018). Entretanto, estudos que demonstrem a efetividade do carvacrol isolado ou de óleos essenciais que contenham esse composto sobre os parâmetros imunológicos em camarões ainda são escassos.

Os resultados das contagens de bactérias heterotróficas totais (BHT) e *Vibrios* spp. na microbiota do intestino dos animais alimentados com diferentes concentrações de carvacrol estão demonstrados na Figura 1. Apesar da inibição significativa *in vitro* obtida no presente trabalho, não foram encontradas diferenças significativas nas contagens das bactérias, embora os tratamentos contendo 1 mg/mL, 3 mg/mL e, principalmente, 4 mg/mL de carvacrol apresentarem contagens menores que o grupo controle e o tratamento com 6 mg/mL de carvacrol.

Figura 1. Contagem microbiológica de bactérias heterotróficas totais (BHT) e *Vibrio* spp. do trato intestinal de *L. vannamei* alimentados com diferentes concentrações de carvacrol e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão das triplicatas e as barras indicam o desvio padrão da média. $p > 0,05$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Estudos realizados anteriormente apontam que o carvacrol adicionado na alimentação animal possivelmente não atinja o trato gastrointestinal, onde deve exercer sua função, pois além do carvacrol acabar sendo diluído durante a passagem pelo trato intestinal, também pode se ligar aos componentes proteicos e lipídicos da ração, diminuindo a concentração efetiva de carvacrol disponível para atividade contra microrganismos (Si et al., 2006; Veldhuizen et al., 2007). Além disso, Astashkina et al. (2012) afirmam que os resultados obtidos em análises *in vitro* nem sempre representam com precisão as propriedades fisiológicas para os testes *in vivo*, podendo explicar a diferença de resultados encontrada nas análises realizadas neste trabalho.

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, no qual não foi possível verificar diferenças significativas entre os tratamentos, Navarrete et al., (2010) também demonstraram grandes similaridades na microbiota de truta-arco-íris tratadas com o óleo essencial de tomilho, contendo 22 g/kg de carvacrol e o grupo controle, não apresentando diferenças estatísticas. Já em outro estudo feito com trutas-arco-íris o autor observou uma melhora da saúde intestinal com a redução de bactérias anaeróbias utilizando dietas contendo carvacrol (GIANNENAS et al., 2012). Além destes, Hong et al. (2012) também não encontraram diferenças na microbiota de aves de corte alimentados com dieta basal e com a adição de óleo essencial de orégano contendo 15 mg/kg de carvacrol.

De maneira curiosa, nossos resultados demonstraram maior abundância de bactérias no tratamento 6 mg/mL e isso pode ter sido causado devido à alta dose de carvacrol. Fato este que corrobora com o estudo feito por Baruah et al. (2017) onde foi demonstrado que larvas de *Artêmia franciscana* imergidas em concentrações superiores a 99,6 µM de carvacrol obtiveram a sobrevivência reduzida significativamente, indicando que o composto pode exercer efeito tóxico no animal sob determinadas condições experimentais. Em vertebrados, já foi comprovado que quando em excesso, o carvacrol possui efeito citotóxico nas células epiteliais intestinais (INAMUCO et al., 2012), o que pode explicar a maior contagem de bactérias no tratamento com 6 mg/mL encontrada no presente estudo.

3.2.4 Desafio frente ao *Vibrio parahaemolyticus*

Após 48 horas do desafio com *V. parahaemolyticus*, o grupo controle apresentou uma mortalidade média de 13,33% e os tratamentos contendo 1 e 3 mg/mL apresentaram uma mortalidade de 15 e 20%, respectivamente. Já os tratamentos 4 e 6 mg/mL apresentaram a mesma mortalidade de 16,67%. Não houve diferenças significativas entre nenhuma das mortalidades observadas (Tabela 6).

Tabela 6. Mortalidade cumulativa de *L. vannamei* alimentados com diferentes concentrações de carvacrol e uma dieta controle, sem adição de carvacrol, após o desafio com o *V. parahaemolyticus*.

Tratamentos	Mortalidade (%)		
	0h	24h	48h
Controle	0	13,33 ± 5,77	13,33 ± 8,16

1 mg/mL	0	15 ± 21,21	15 ± 12,25
3 mg/mL	0	16,67 ± 11,55	20 ± 10,95
4 mg/mL	0	16,67 ± 15,28	16,67 ± 13,29
6 mg/mL	0	13,33 ± 5,77	16,67 ± 7,53

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão das triplicatas. $p > 0,05$.

Diversos estudos já foram realizados analisando a efetividade do carvacrol frente à infecções bacterianas, como o realizado por Gracia-valenzuela et al. (2014), onde os grupos de *L. vannamei* alimentados com a adição de óleo essencial de orégano contendo 40% de carvacrol e 25% de timol se mostraram mais resistentes à infecção frente as diferentes espécies de vibrios, entre estes, *V. parahaemolyticus*, com mortalidades reduzidas quando comparadas com o grupo controle. Já as larvas de *Artêmia franciscana* que passaram por um tratamento de imersão em carvacrol e foram desafiadas com *V. harveyi* obtiveram a mortalidade reduzida quando comparadas com o grupo que não passou pelo tratamento prévio (BARUAH et al., 2017).

Nos peixes, Zheng et al. (2009) conseguiram uma redução de 12% na mortalidade de bagres-do-canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados com a adição de carvacrol na dieta após serem infectados com a bactéria *Aeromonas hydrophila*. Além disso, no mesmo estudo foi demonstrado uma redução de 21% na mortalidade após o desafio dos animais alimentados com uma dieta contendo carvacrol e timol juntos. Além deste, no estudo feito com a adição de duas concentrações de carvacrol (0,025 e 0,05%) na dieta do robalo-europeu mostrou uma redução na mortalidade dos animais após a infecção frente ao *Vibrio anguillarum* quando comparados com o grupo controle (VOLPATTI et al., 2012).

À uma concentração de 200 ppm, o carvacrol diminuiu a mortalidade de tilápias (*Oreochromis niloticus*) infectadas com a bactéria patogênica *Edwardsiella tarda* (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010). Outro estudo feito com tilápias também mostrou uma mortalidade reduzida após a infecção com *V. alginolyticus* nos animais alimentados com um produto comercial feito à base de óleo essencial de orégano. (ABDEL-LATIF; KHALIL, 2014).

Segundo HEIPIEPER et al. (1992), a efetividade da ação antimicrobiana do carvacrol depende da sua concentração e tempo de exposição. Diferente dos vertebrados, os camarões não possuem um sistema imune adaptativo, e sim um sistema imune inato com respostas de

defesa menos complexas, o que resulta na maior dificuldade do animal de se proteger de uma infecção por seu sistema imunológico (SARATHI et al., 2007). Além disso, os resultados encontrados nesse estudo podem ser justificados devido à algumas propriedades físico-químicas do carvacrol, como a baixa solubilidade em água, alta volatilidade e baixa estabilidade química, dificultando assim obter-se bons resultados à níveis plasmáticos (BADI et al., 2017). Outro fator a ser levado em consideração é que o carvacrol atua melhor em pH ácido (NOSTRO et al., 2012), caso este que é o contrário do encontrado neste estudo. Portanto, diferente dos resultados promissores obtidos *in vitro*, não foi possível encontrar o mesmo resultado *in vivo*.

4 CONCLUSÃO

O carvacrol possui efeito inibitório *in vitro* frente a todos os diferentes patógenos analisados que afetam o cultivo de camarões. Apesar disso, a ração suplementada com o composto não influencia os parâmetros zootécnicos, microbiológicos e imunológicos do *L. vannamei*.

Os camarões alimentados com diferentes concentrações de carvacrol também não apresentaram maior resistência frente a infecção com *V. parahaemolyticus*.

Portanto, o presente estudo serve como base para trabalhos futuros, onde análises metagenômicas e histológicas podem ser realizadas para que se obtenha repostas mais concretas sobre o efeito do carvacrol no organismo do *L. vannamei*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATIF, Hany MR; KHALIL, Riad H. Evaluation of two Phytobiotics, *Spirulina platensis* and *Origanum vulgare* extract on Growth, Serum antioxidant activities and Resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to pathogenic *Vibrio alginolyticus*. **Int J Fish Aquat Stud**, v. 1, p. 250-255, 2014.

AHMADIFAR, E. *et al.* Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal Of Applied Ichthyology**, v. 27, n. 4, p. 1057-1060, 18 maio 2011. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01763.x>.

ALTAN, Aylin *et al.* Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly (lactic acid) for active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 48-59, ago. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.028>.

ALVES, Vera L.c.d. *et al.* Preparation and characterization of a chitosan film with grape seed extract-carvacrol microcapsules and its effect on the shelf-life of refrigerated Salmon (*Salmo salar*). **Lwt**, v. 89, p. 525-534, mar. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.013>.

AMER, Shimaa A. *et al.* The influence of dietary supplementation of cinnamaldehyde and thymol on the growth performance, immunity and antioxidant status of monosex Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). **The Egyptian Journal Of Aquatic Research**, v. 44, n. 3, p. 251-256, set. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2018.07.004>.

ARAUJO, Márcio Martins de *et al.* Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, 2016. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000702014>.

ASTASHKINA, Anna *et al.* A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 134, n. 1, p. 82-106, abr. 2012. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.01.001>.

BADI, H Naghdi *et al.* An Overview on Two Valuable Natural and Bioactive Compounds, Thymol and Carvacrol, in Medicinal Plants. **Journal Of Medicinal Plants**. Karaj, p. 1-32. 07 ago. 2017.

BARRACCO, M. A. *et al.* **Guía técnica-patología e inmunología de camarones penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei. Panamá, Rep. de Panamá, 2008.**

BARUAH, Kartik *et al.* Enhanced resistance against *Vibrio harveyi* infection by carvacrol and its association with the induction of heat shock protein 72 in gnotobiotic *Artemia*

franciscana. **Cell Stress And Chaperones**, v. 22, n. 3, p. 377-387, 16 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1007/s12192-017-0775-z>

BASSANETTI, Irene *et al.* Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. **Food Control**, v. 73, p. 606-612, mar. 2017. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.010>.

BRADFORD, Marion M. *et al.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976. Elsevier BV.

[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

CÁRDENAS, Jessie Vargas *et al.* Assessment of different levels of green and brown seaweed meal in experimental diets for whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone) in recirculating aquaculture system. **Aquaculture International**, v. 23, n. 6, p. 1491-1504, 13 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10499-015-9899-2>.

CERENIUS, Lage *et al.* The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 116-126, abr. 2004. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>.

CHAKRABORTY, Suman Bhusan *et al.* Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. **Reviews In Aquaculture**, v. 3, n. 3, p. 103-119, 25 ago. 2011. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x>.

CHANG, Yueh-ping *et al.* Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 2, p. 284-290, fev. 2012. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.017>.

CHEN, Fei *et al.* Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 30-39, 1 set. 2009. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1002/bit.22363>.

CHUMPOL, Supaporn *et al.* In vitro and in vivo selection of probiotic purple nonsulphur bacteria with an ability to inhibit shrimp pathogens: acute hepatopancreatic necrosis disease-causing vibrio parahaemolyticus and other vibrios. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 6, p. 3182-3197, 11 jul. 2016. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1111/are.13149>.

CIANDRINI, Eleonora *et al.* In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 8, p. 2001-2013, 24 jan. 2014. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00784-013-1179-9>.

CORONEL, Lincoln Garcia. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de algas frente a bactérias patogênicas para aquicultura**. 2016. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

CORRÊA, Nicole Machado *et al.* Dietary supplementation with probiotic and butyrate in the shrimp nursery in biofloc. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 3, p. 3-7, 26 jun. 2018. Boletim do Instituto de Pesca.
<http://dx.doi.org/10.20950/1678-2305.2018.348>.

DEFOIRDT, Tom *et al.* Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current Opinion In Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 251-258, jun. 2011. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004>.

DE NEGREIROS, Luiza M S; SANTOS, Daniele B. Doenças microbianas na carcinicultura brasileira: uma revisão. **CARPE DIEM: Revista Cultural e Científica do UNIFACEX**, v. 13, n. 1, p. 107-124, 2015.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, Stanley G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>.

FANG, Shiyuan *et al.* Antimicrobial Carvacrol Incorporated in Flaxseed Gum-Sodium Alginate Active Films to Improve the Quality Attributes of Chinese Sea bass (*Lateolabrax maculatus*) during Cold Storage. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 3292, 10 set. 2019. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules24183292>.

FAO. 2013. **Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPND) of Cultured Shrimp**, 2013. Hanoi, Viet Nam, 25–27.

FAO. 2018. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible**. Roma.

FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture. Sustainability in Action. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2020.

FDA (2017) CFR—Code of federal regulations, title 21 3: 25–26.

FERREIRA, Pollyanna de Moraes França *et al.* Essential Oregano Oil as a Growth Promoter for the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 45, n. 1, p. 28-34, fev. 2014. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/jwas.12094>.

FLORES-MIRANDA, Ma. del Carmen *et al.* Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. **Aquaculture**, v. 320, n. 1-2, p. 51-55, out. 2011. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.005>.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed.: Artmed, 2013. 607 p.

GIANNENAS, I. *et al.* Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 350-353, p. 26-32, jun. 2012. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.027>.

GONG, Hui *et al.* Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 190, n. 3-4, p. 305-324, nov. 2000. Elsevier BV.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00414-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00414-2).

GRACIA-VALENZUELA, M.h. *et al.* Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against *Vibrio* bacteria in shrimps. **Archives Of Biological Sciences**, v. 66, n. 4, p. 1367-1370, 2014. National Library of Serbia.

<http://dx.doi.org/10.2298/abs1404367g>.

GUARDA, Abel *et al.* The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 144-150, mar. 2011. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011>.

GURSOY, Ulvi Kahraman *et al.* Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. **Anaerobe**, v. 15, n. 4, p. 164-167, ago. 2009. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.02.004>.

HASHEMIPOUR, H. *et al.* Effects of carboxy methyl cellulose and thymol + carvacrol on performance, digesta viscosity and some blood metabolites of broilers. **Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition**, v. 98, n. 4, p. 672-679, 16 set. 2013. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12121>.

HE, Wangquan *et al.* Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 70, p. 164-173, nov. 2017. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.007>.

HEIPIEPER, HERMANN-JOSEF; DIEFENBACH, R. U. T. H.; KEWELOH, H. Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1847-1852, 1992.

HELANDER, Ilkka M. *et al.* Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, set. 1998. American Chemical Society (ACS).

<http://dx.doi.org/10.1021/jf980154m>.

HERNANDES, C. *et al.* *Lippia origanoid* essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 900-910, 15 fev. 2017. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/jam.13398>.

HONG, Jia-chi *et al.* Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. **Livestock Science**, v. 144, n. 3, p. 253-262, abr. 2012. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2011.12.008>.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**, v. 43, 49p., Rio de Janeiro, 2016.

INAMUCO, Jeanine *et al.* Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella Typhimurium* motility and invasion of porcine epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1-2, p. 200-207, maio 2012. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.021>.

KARAM, Layal *et al.* Combined effects of thymol, carvacrol and packaging on the shelf-life of marinated chicken. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 291, p. 42-47, fev. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.008>.

LAFFERTY, Kevin D. *et al.* Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. **Annual Review Of Marine Science**, v. 7, n. 1, p. 471-496, 3 jan. 2015. Annual Reviews.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>.

LA STORIA, Antonietta *et al.* Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research In Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 164-172, fev. 2011. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2010.11.006>.

LIGHTNER D V. *et al.* Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. **Global Aquaculture Advocate**. p. 40, jan/fev de 2012.

LIOLIOS, C.c. *et al.* Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 77-83, jan. 2009. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.060>.

MAGGIONI, Daniela S. *et al.* Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. **Aquaculture**, v. 241, n. 1-4, p. 501-515, nov. 2004. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(03\)00530-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(03)00530-1).

MANJUSHA, S. *et al.* Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas. **American Journal Of Biochemistry And Biotechnology**. p. 193-198. 2005.

MCGINTY, A.S. and J.E. Rakocy. 2003. **Cage culture of tilapia**. SRAC 281.

MORO, Armando *et al.* Dairy matrix effect on the transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 95, n. 7, p. 1507-1513, 26 ago. 2014. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6853>.

MURRAY, Patrick R. *et al.* **Microbiología Médica**. 8. ed.: Elsevier, 2017. 836 p.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (US). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2006.

NAVARRETE, Paola *et al.* Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. **Aquaculture Research**, p. 253-262, 16 jul. 2010. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02590.x>.

NOSTRO, Antonia *et al.* Enhanced activity of carvacrol against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an acidic environment. **Apmis**, v. 120, n. 12, p. 967-973, 5 jul. 2012. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02928.x>.

NRC - National Research Council. 2011. Committee on Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. 1st ed. NRC National Academic Press, Washington.

OLIVEIRA, Eder José de *et al.* **Crescimento e sobrevivência de pós-larvas de jundiá (*Rhamdia* sp) suplementadas com óleo essencial de orégano**. In: VI JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA. Chapecó: 2016. 6 p.

PESAVENTO, G. *et al.* Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p. 188-199, ago. 2015. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.045>.

RAJASEKAR, T. *et al.* Immunostimulatory effects of *Cardiospermum halicacubum* against *Vibrio parahaemolyticus* on tiger shrimp *Penaeus monodon*. **J. Chem. Pharm. Res**, v. 3, n. 5, p. 501-513, 2011.

RANDRIANARIVELO, R. *et al.* Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: effects of the essential oil of *Cinnamosma fragrans* survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae. **Journal Of Applied Microbiology**, p. 642-650, fev. 2010. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04694.x>.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P.. Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against *Edwardsiella tarda* in vitro and in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 5, p. 420-425, 2010.

RAY, Andrew J. *et al.* Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. **Aquaculture**, v. 299, n. 1-4, p. 89-98, fev. 2010. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.021>.

REGO, Marcelo *et al.* Utilização de probiótico e antibiótico no cultivo de pós-larvas do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. **Atlântica (Rio Grande)**, v. 34, n. 2, p. 137-143, 2012.

SARATHI, M. *et al.* Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 271, n. 1-4, p. 8-20, out. 2007. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.002>.

SI, W. *et al.* In vitro assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards *Salmonella* serotype *Typhimurium* DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 6, p. 1282-1291, 2006.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03045.x>.

SMITH, Valerie J. *et al.* Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, Crangon. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 101, n. 3, p. 641-649, abr. 1992. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(92\)90099-s](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(92)90099-s).

SNOUSSI, Mejdj *et al.* In-vitro anti-*Vibrio* spp. activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 3071-3076, 29 jul. 2008. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-008-9811-6>.

SODERHALL, K *et al.* Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, v. 797, n. 1, p. 99-104, 24 jan. 1984. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165\(84\)90387-8](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165(84)90387-8).

SOTELO-BOYÁS, M. *et al.* Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. **International journal of biological macromolecules**, v. 103, p. 409-414, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.063>.

SYED, Irshaan *et al.* Oil-in-water emulsions of geraniol and carvacrol improve the antibacterial activity of these compounds on raw goat meat surface during extended storage at 4 °C. **Food Control**, v. 107, p. 106757, jan. 2020. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106757>.

TOMAZELLI-JÚNIOR, O. *et al.* Microencapsulation of essential thyme oil by spray drying and its antimicrobial evaluation against *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Brazilian Journal Of Biology**, v. 78, n. 2, p. 311-317, 17 ago. 2017. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.08716>.

TRAN, L *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases Of Aquatic Organisms**, v. 105, n. 1, p. 45-55, 9 jul. 2013. Inter-Research Science Center.
<http://dx.doi.org/10.3354/dao02621>.

VAN WYK, Peter; SCARPA, John. Water Quality Requirements and Management. In: VAN WYK, Peter; DAVIS-HODGKINS, Megan; LARAMORE, Rolland; MAIN, Kevan L.; MOUNTAIN, Joe; SCARPA, John. **Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems**. Tallahassee: Florida Department Of Agriculture And Consumer Services, 1999. Cap. 8. p. 141-162.

VASCONCELOS, Sara Edwrigens Costa Benício *et al.* *Plectranthus amboinicus* essential oil and carvacrol bioactive against planktonic and biofilm of oxacillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 000-002, 16 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12906-017-1968-9>.

VELDHUIZEN, Edwin J. A *et al.* Low temperature and binding to food components inhibit the antibacterial activity of carvacrol against *Listeria monocytogenes* in steak tartare. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 9, p. 2127-2132, 2007.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2127>.

VELDHUIZEN, Edwin J. A. *et al.* Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1874-1879, mar. 2006. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/jf052564y>.

VINATEA, L. A. A.. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura**: uma revisão para peixes e camarões. 2. ed. Florianópolis: da Ufsc, 2004. 231 p.

VOLPATTI, Donatella *et al.* Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella (Vibrio) anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 1, p. 31-44, 13 jun. 2012. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03202.x>.

WEN, Chongqing *et al.* Evaluating the potential of marine *Bacteriovorax* sp. DA5 as a biocontrol agent against vibriosis in *Litopenaeus vannamei* larvae. **Veterinary Microbiology**, v. 173, n. 1-2, p. 84-91, set. 2014. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.07.022>.

WONGTAVATCHAI, J. *et al.* Effect of AquaVac™ Vibromax™ on size and health of post larva stage of Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* and Black Tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 308, n. 3-4, p. 75-81, out. 2010. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.017>.

YEH, Ruo-yun *et al.* Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 1, p. 26-32, jul. 2009. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.11.008>.

ZHENG, Z.I. *et al.* 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, n. 3-4, p. 214-218, jul. 2009. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.025>.

ZHOU, Qi-cun *et al.* Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 364-365, p. 252-258, out. 2012. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.020>.