

Aline Brum Figueredo

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE
MANJERICÃO (*Ocimum gratissimum* L.) E GENGIBRE (*Zingiber
officinale* Rosc.) NA DIETA DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis
niloticus* L.)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Aquicultura.

Orientador: Maurício Laterça Martins

Coorientadora: Edsandra Campos Chagas

Florianópolis
2017

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

Figueredo, Aline Brum

Suplementação com óleos essenciais de manjeriço (Ocimum gratissimum L.) e gengibre (Zingiber officinale Rosc.) na dieta de tilápia-do-nylo (Oreochromis niloticus L.) / Aline Brum Figueredo ; orientador, Maurício Laterça Martins, coorientadora, Edsandra Campos Chagas, 2017.
171 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. imunomoduladores. 3. hematologia. 4. histologia. 5. Streptococcus agalactiae. I. Martins, Maurício Laterça . II. Chagas, Edsandra Campos . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Suplementação com óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum gratissimum* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) na dieta de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.)

Por

ALINE BRUM FIGUEREDO

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

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



Prof. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura/UFSC
Portaria 1889/GR/2017

Banca Examinadora:



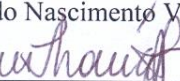
Dr. Mauricio Laterça Martins – Orientador



Dr. André Luís Ferreira Lima - UFSC



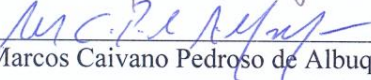
Dr. Eduardo Cargini Ferreira - IFC



Dr. Felipe do Nascimento Vieira - UFSC



Dra. Gabriela Tomas Jerônimo - UNINILTON



Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque - UFSC

Dedico este trabalho à minha avó,
Glória Terezinha Genro de Brum, e à
minha mãe, Márcia Genro de Brum.

AGRADECIMENTOS

À minha avó, Glória, e minha mãe, Márcia, por todo o amor, pelo exemplo, pela educação que me abriu tantas portas e pelo incentivo às escolhas que fiz;

Ao meu noivo, Rafael Ruschel, por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre me apoiando e me incentivando a batalhar por meus sonhos;

Ao meu orientador, Prof. Maurício Laterça Martins, por todas as oportunidades, pela confiança, pelo apoio e por me inspirar a ser cada vez melhor como profissional e como ser humano;

À Dra. Edsandra Campos Chagas, pela valiosa coorientação, por sempre responder prontamente às minhas dúvidas e solicitações, e pela confiança dispensada para executar este projeto;

Ao Dr. Eduardo Cargnin Ferreira, à Dra. Gabriela Tomas Jerônimo, ao Dr. Felipe do Nascimento Vieira, ao Dr. Andre Luis Ferreira Lima e ao Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque, pela participação na banca examinadora e por suas valiosas contribuições;

Ao Prof. José Luiz Pedreira Mouriño, por todos os auxílios, explicações e sugestões, que foram muito enriquecedores para este trabalho;

A todos os amigos do Laboratório AQUOS, pela ajuda que foi essencial durante a execução deste projeto, além dos momentos de alegria e descontração;

Em especial ao Lucas Cardoso, pelas incontáveis tardes me auxiliando na histologia, e principalmente, pelos conselhos, ensinamentos e amizade;

À Scheila Anelise Pereira, por sua alegre companhia nos dias de experimento e pela ajuda fundamental nas análises imunológicas;

Ao Marco Shizuo Owatari, pela incrível disposição em me auxiliar e a solucionar problemas durante o experimento;

Ao professores do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, por todos os ensinamentos ao longo do curso;

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Carlito Klunk, por sua prestabilidade em atender os alunos e pela valiosa ajuda em diversas ocasiões;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo financiamento do projeto;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos;

A todos que, de alguma forma, contribuíram com a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Oh! Imensa é a graça poderosa que reside
nas ervas e plantas, e em suas raras qualidades;
Porque na terra não existe nada tão vil
que não preste à terra algum benefício especial;
Nem há nada tão bom que, desviado de seu verdadeiro uso,
não transtorne sua verdadeira origem, caindo em abuso;
A própria virtude se converte em vício, se mal aplicada,
e, às vezes, o vício se dignifica pela ação;
Dentro do terno cálice da débil flor
residem o veneno e o poder medicinal...”

“Romeu e Julieta”, Cena III, Ato II
William Shakespeare (1564-1616)

RESUMO

O aumento na produção de peixes nas últimas décadas é acompanhado por prejuízos econômicos devido a enfermidades, havendo a necessidade de estabelecer técnicas eficazes e seguras de profilaxia. O uso profilático de produtos naturais desperta interesse, pois tendem a apresentar menor toxicidade e alto potencial de biodegradação. O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da suplementação dietária com óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale*) e manjeriçãocravo (*Ocimum gratissimum*) sobre o desempenho zootécnico, parâmetros hemato-imunológicos e bioquímicos, histologia de órgãos internos e resistência à infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Hum mil e oitenta juvenis foram distribuídos em 24 tanques e receberam rações suplementadas com óleos essenciais de *O. gratissimum* ou *Z. officinale* (0,5; 1,0 e 1,5%). Após 35 e 55 dias, foram realizadas coletas para análises hemato-imunológicas, bioquímicas e histológicas. Após, os peixes foram desafiados com *S. agalactiae* e monitorados por 10 dias, para observação de sinais clínicos e mortalidade. Ao final, foi realizada coleta destinada a análises hematológicas e histológicas. Após 55 dias de suplementação, os peixes tratados com manjeriçãocravo a 0,5% apresentaram melhoria na conversão alimentar, além de aumento na atividade fagocitária dos leucócitos em todos os peixes alimentados com ração suplementada, com exceção dos alimentados com gengibre a 1,5%. Todas as dietas suplementadas proporcionaram redução nos níveis séricos de colesterol e triglicérides. Na histologia, dietas suplementadas com óleos essenciais por 55 dias proporcionaram redução no grau de microesteatose cardíaca, descolamento do epitélio das lamelas e hiperplasia nas brânquias. Em peixes infectados, dietas suplementadas amenizaram o grau de congestão, necrose e microesteatose hepática, além da microesteatose cardíaca e congestão nas brânquias. A suplementação com óleos essenciais foi útil para promover o crescimento e resistência a enfermidades em tilápia-do-nilo, além de prevenir danos teciduais, quando aplicados em dose adequada.

Palavras-chave: Aquicultura, imunomoduladores, hematologia, histologia, *Streptococcus agalactiae*

ABSTRACT

The increase in fish production in the last decades is accompanied by economic losses due to diseases, and it is necessary to establish effective and safe prophylaxis techniques. The prophylactic use of natural products arouses interest, as they tend to present low toxicity and high biodegradation potential. The aim of this study was to verify the effects of dietary supplementation with essential oils of ginger (*Zingiber officinale*) and clove basil (*Ocimum gratissimum*) on growth performance, hemato-immunological and biochemical parameters, histology of internal organs and survival to challenge with *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). One thousand and eighty juveniles were distributed in 24 tanks and fed diets supplemented with essential oils of *O. gratissimum* or *Z. officinale* (0.5, 1.0 and 1.5%). After 35 and 55 days, samplings were collected for hemato-immunological, biochemical and histological analyzes. The remaining fish were challenged with *S. agalactiae* and monitored for 10 days for observation of clinical signs and mortality. At the end of the trial, collection was made for hematological and histological analyzes. After 55 days of supplementation, fish fed supplemented diet with 0.5% basil showed improved feed conversion and increased leukocyte phagocytic activity in all supplemented fish, except for those fed ginger at 1.5%. All supplemented diets provided reduction in serum cholesterol and triglyceride levels. In the histology, the diets supplemented with essential oils for 55 days provided reduction in the degree of cardiac microsteatosis, lamellar epithelial detachment and hyperplasia in the gills. In infected fish, supplemented diets attenuated the degree of congestion, necrosis and microsteatosis in liver, as well as cardiac microsteatosis and congestion in the gills. The supplementation with essential oils was useful to promote the growth and resistance to diseases in Nile tilapia, besides to prevent tissue damage, when applied in proper dose.

Keywords: Aquaculture, immunomodulators, hematology, histology, *Streptococcus agalactiae*.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 – Produção mundial de pescado, em milhões de toneladas, por aquicultura e captura	24
Figura 2 – Divisão da produção aquícola mundial no ano de 2015 entre as diferentes modalidades de aquicultura, em relação ao volume de produção e à receita	24
Figura 3 – Divisão da receita da produção aquícola brasileira no ano de 2015 entre as diferentes modalidades de aquicultura	26
Figura 4 – Importância percentual das principais espécies de peixes produzidas pela piscicultura continental no estado de Santa Catarina em 2015	27
Figura 5 – Desenho esquemático do delineamento experimental	50

CAPÍTULO I

Fig. 1. Composição dos óleos essenciais. A. Manjeriçãocravo (<i>Ocimum gratissimum</i>) B. Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>). n.i. = compostos não identificados	72
Fig. 2. Número de peixes mortos por tratamento, dez dias após desafio com <i>Streptococcus agalactiae</i>	80

CAPÍTULO II

Resumo gráfico	94
Graphical abstract.....	94
Figura 1. Composição dos óleos essenciais. A. Manjeriçãocravo (<i>Ocimum gratissimum</i>) B. Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>). n.i. = compostos não identificados	99

CAPÍTULO III

Fig. 1. Composição dos óleos essenciais. A. Manjeriçãocravo (<i>Ocimum gratissimum</i>) B. Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>). n.i. = compostos não identificados	120
--	-----

Fig. 2. Alterações histológicas em tilápias-do-nilo após 55 dias de suplementação. A: Tecido cardíaco de peixe tratado com manjeriçã a 1,0%, sem esteatose; B: Microesteatose cardíaca em peixe do grupo controle; C: Tecido branquial de peixe tratado com manjeriçã a 0,5%; D: Tecido branquial de peixe do grupo controle, com descolamento do epitélio da lamela secundária; E: Tecido branquial de peixe tratado com gengibre a 1,0%, mostrando baixo grau de hiperplasia interlamelar; F: Tecido branquial de peixe do grupo controle, com grau moderado de hiperplasia interlamelar e fusão de lamelas secundárias. Coloração: HE, Barra: 50 µm.....134

Fig. 3. Alterações histológicas em tilápias-do-nilo dez dias após infecção com *S. agalactiae*. A: Tecido hepático de peixe tratado com manjeriçã a 0,5%, mostrando sinusoides liberados (asteriscos) B: Tecido hepático de peixe do grupo controle, com sinusoides congestos (asteriscos); C: Tecido hepático de peixe tratado com manjeriçã a 0,5%, hepatócitos com formato hexagonal típico; D: Tecido hepático de peixe do grupo controle, com área de necrose (asterisco), microesteatose e hepatócitos com aspecto balonoso; E: Tecido cardíaco de peixe tratado com manjeriçã a 0,5%, mostrando aspecto normal; F: Tecido cardíaco de peixe do grupo controle, com microesteatose (cabeças de seta), necrose e infiltrado inflamatório eosinofílico; G: Brânquia de peixe tratado com manjeriçã a 1,5%, sem congestão; H: Brânquia de peixe do grupo controle, com congestão na base das lamelas secundárias (seta). Coloração: HE, Barra: 50 µm.....135

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1 – Alimentação diária de tilápias-do-nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) de acordo com o peso corporal, a 26-30° C (Fonte: Nicoluzzi Rações, Brasil).....	52
---	----

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Parâmetros de crescimento (média ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo após 55 dias de suplementação com óleos essenciais de gengibre (<i>Zingiber officinale</i>) e manjerição-cravo (<i>Ocimum gratissimum</i>). TCE = taxa de crescimento específico, FCA= fator de conversão alimentar.....	71
---	----

Tabela 2- Parâmetros hematológicos (média ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo após 35 dias de suplementação com óleos essenciais de gengibre (<i>Zingiber officinale</i>) e manjerição-cravo (<i>Ocimum gratissimum</i>). VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT= proteína plasmática total.....	74
--	----

Tabela 3- Parâmetros hematológicos (média ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo após 55 dias de suplementação com óleos essenciais de gengibre (<i>Zingiber officinale</i>) e manjerição-cravo (<i>Ocimum gratissimum</i>). VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT= proteína plasmática total.....	75
--	----

Tabela 4 - Parâmetros hematológicos (média ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo dez dias após infecção com <i>Streptococcus agalactiae</i> . VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT= proteína plasmática total.....	77
--	----

Tabela 5- Percentual de fagocitose (média ± desvio padrão) no sangue de tilápias-do-nilo no sangue de tilápias-do-nilo aos 35 e 55 dias de suplementação com óleos essenciais de gengibre (<i>Zingiber officinale</i>) e manjerição-cravo (<i>Ocimum gratissimum</i>) e dez dias após desafio experimental com <i>Streptococcus agalactiae</i>	78
--	----

Tabela 6 – Parâmetros imunológicos do soro (média ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo após 35 e 55 dias de suplementação com óleos essenciais de gengibre (<i>Zingiber officinale</i>) e manjerição-cravo (<i>Ocimum gratissimum</i>).....	78
---	----

Tabela 7 – Mortalidade e porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) em tilápias-do-nilo dez dias após desafio com *Streptococcus agalactiae* ...79

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Glicose plasmática e parâmetros bioquímicos do soro em tilápias-do-nilo tratadas com óleos essenciais de manjerição-cravo e gengibre, aos 35 e 55 dias de suplementação105

Tabela 2 – Número de centros de melanomacrófagos e área total do baço ocupada por centros em tilápias-do-nilo tratadas com óleos essenciais de manjerição-cravo e gengibre.....106

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Morfometria intestinal de tilápia-do-nilo suplementada com óleos essenciais de manjerição-cravo e gengibre por 55 dias e 10 dias após desafio com *Streptococcus agalactiae*124

Tabela 2 – Intensidade de alterações histológicas no intestino de tilápia-do-nilo suplementada com óleos essenciais de manjerição-cravo e gengibre, aos 55 dias de suplementação e 10 dias após desafio com *Streptococcus agalactiae*.....125

Tabela 3 – Intensidade de alterações histológicas no fígado de tilápia-do-nilo suplementada com óleos essenciais de manjerição-cravo e gengibre, aos 55 dias de suplementação e 10 dias após desafio com *Streptococcus agalactiae*.....128

Tabela 4 – Intensidade de alterações histológicas no baço de tilápia-do-nilo suplementada com óleos essenciais de manjerição-cravo e gengibre, aos 55 dias de suplementação e 10 dias após desafio com *Streptococcus agalactiae* 130

Tabela 5 – Intensidade de alterações histológicas no tecido cardíaco de tilápia-do-nilo suplementada com óleos essenciais de manjerição-cravo e gengibre, aos 55 dias de suplementação e 10 dias após desafio com *Streptococcus agalactiae*.....131

Tabela 6 – Intensidade de alterações histológicas nas brânquias de tilápia-do-nilo suplementada com óleos essenciais de manjerição-cravo e gengibre, aos 55 dias de suplementação e 10 dias após desafio com *Streptococcus agalactiae*. LS= lamela secundária132

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	23
Aquicultura mundial	23
Aquicultura no Brasil	25
Aquicultura em Santa Catarina	26
Biologia e cultivo da tilápia-do-nilo (<i>O. niloticus</i>)	27
Enfermidades na piscicultura	30
Infecções causadas por <i>Streptococcus agalactiae</i>	31
Tratamentos de infecções na piscicultura	34
Uso de produtos naturais na piscicultura	35
Manjeriço-cravo (<i>Ocimum gratissimum</i>)	37
Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	40
JUSTIFICATIVA.....	45
OBJETIVOS.....	47
Objetivo Geral	47
Objetivos Específicos	47
METODOLOGIA GERAL	49
Obtenção dos peixes	49
Condições experimentais	49
Óleos essenciais	50
Preparo das dietas	51
Rotina de alimentação	51
Desempenho zootécnico	52
Análises hematológicas e preparo do soro	52
Atividade fagocitária	53
Análises do soro	54
<i>Proteína sérica total</i>	54
<i>Imunoglobulinas</i>	54
<i>Título de aglutinação</i>	54
<i>Atividade da lisozima</i>	54

<i>Colesterol e triglicérides</i>	55
Análises histológicas	55
Desafio com <i>Streptococcus agalactiae</i>	56
Análises estatísticas	57
FORMATAÇÃO DOS CAPÍTULOS DA TESE.....	58
CAPÍTULO I - “Efeito de óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre em tilápias-do-nilo desafiadas com <i>Streptococcus agalactiae</i> ”	59
Resumo	60
Abstract	61
Destaques	62
1.Introdução	62
2. Material e métodos	64
2.1. <i>Peixes e condições experimentais</i>	64
2.2. <i>Extração dos óleos essenciais e determinação de sua composição</i>	65
2.3. <i>Preparo das dietas suplementadas</i>	65
2.4. <i>Rotina de alimentação</i>	66
2.5. <i>Parâmetros de crescimento</i>	66
2.6. <i>Coleta de soro e análises hematológicas</i>	66
2.7. <i>Atividade fagocitária</i>	67
2.8. <i>Proteína sérica total e imunoglobulinas</i>	68
2.9. <i>Título de aglutinação do soro</i>	68
2.10. <i>Desafio com <i>Streptococcus agalactiae</i></i>	68
2.11. <i>Análises estatísticas</i>	69
3. Resultados	69
3.1. <i>Composição dos óleos essenciais</i>	69
3.2. <i>Qualidade da água</i>	70
3.3. <i>Parâmetros de crescimento</i>	70
3.4. <i>Parâmetros hematológicos</i>	72
3.5. <i>Atividade fagocitária</i>	76
3.6. <i>Parâmetros imunológicos do soro</i>	76
3.7. <i>Mortalidade após o desafio</i>	79
4. Discussão	80
5. Conclusões	85
6.Agradecimentos	85

7.Referências	85
CAPÍTULO II - “Parâmetros bioquímicos do sangue e centros de melanomacrófagos em tilápias-do-nilo após suplementação dietária com óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre”.....	91
Resumo	92
Abstract	93
Resumo gráfico	94
Graphical abstract	94
Destaques	95
1.Introdução	95
2.Material e métodos	97
2.1.Peixes e condições experimentais.....	97
2.2.Extração e composição dos óleos essenciais.....	98
2.3.Preparo das dietas, alimentação e obtenção de soro.....	98
2.4.Determinação da glicose plasmática.....	98
2.5.Parâmetros bioquímicos do soro.....	98
2.6.Atividade da lisozima.....	99
2.7. Centros de melanomacrófagos no baço.....	100
2.8.Análises estatísticas.....	100
3.Resultados	100
3.1.Parâmetros bioquímicos do sangue.....	100
3.2.Atividade da lisozima.....	101
3.3.Centros de melanomacrófagos no baço.....	101
4.Discussão	101
5.Conclusões	106
6.Agradecimentos	107
7.Referências	107
CAPÍTULO III - “Alterações histológicas em tilápias-do-nilo após suplementação dietária com óleos essenciais de manjeriço e gengibre e desafio com <i>Streptococcus agalactiae</i> ”.....	113
Resumo	114
Abstract	115
Destaques	116
1.Introdução	116
2.Material e métodos	117
2.1.Peixes e condições experimentais.....	117
2.2.Extração e composição dos óleos essenciais.....	119

2.3.Preparo das dietas, rotina de alimentação e desafio com <i>S. agalactiae</i>	119
2.4.Análises histológicas.....	119
2.5.Reisolamento da bactéria.....	121
2.6.Análises estatísticas	121
3.Resultados	122
3.1.Morfometria intestinal	122
3.2. Alterações histológicas	122
4.Discussão	127
5.Conclusões	140
6.Agradecimentos	140
7.Referências	140
CONCLUSÕES GERAIS	145
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	147
ANEXO I – Artigo referente ao Capítulo I.....	169
ANEXO II - Histologia de órgãos internos de tilápias-do-nilo suplementadas com óleos essenciais e desafiadas com <i>Streptococcus agalactiae</i>	170

INTRODUÇÃO GERAL

Aquicultura mundial

O pescado é, atualmente, a fonte mais acessível de proteína animal e nutrientes essenciais para grande parte de população mundial. Atualmente, a aquicultura é responsável pela produção de mais 50% do todo o pescado consumido no mundo, além contribuir para a recuperação de populações de espécies aquáticas em ambiente natural e de servir como fonte de renda para boa parte da população. O pescado está entre os itens alimentares mais comercializados no mundo, sendo que mais da metade do valor das exportações origina-se de países e regiões em desenvolvimento (FAO, 2016a).

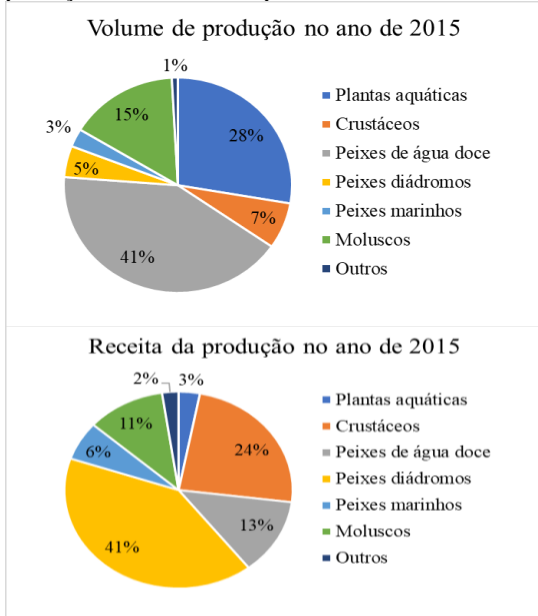
Nos últimos anos, a produção da pesca encontra-se estagnada em cerca de 90 milhões de toneladas, apesar do aumento do esforço da atividade (SILVEIRA et al., 2015). A aquicultura tem sido essencial para suprir a crescente demanda de pescado e atingiu um marco histórico no ano de 2014, superando pela primeira vez a oferta de pescado por captura (Figura 1) (FAO, 2016a). No ano de 2015, a produção total da aquicultura foi de 106 milhões de toneladas, correspondendo à receita de aproximadamente 162 bilhões de dólares e aumento de 35% nos últimos cinco anos (FAO, 2017).

Neste contexto, a produção de peixes de água doce foi responsável por 41,5% do total produzido em 2015, com 44 milhões de toneladas e receita aproximada de 20 bilhões de dólares (13% da receita total) (FAO, 2017). As plantas aquáticas também se destacam por seu volume de produção, que corresponde a cerca de 28% do total, entretanto, por apresentarem valor de mercado mais baixo, contribuem com somente 3% da receita. Os moluscos correspondem a 15% (16 milhões de toneladas) do volume total de produção e contribuem com 11% da receita. Crustáceos, peixes diádromos e peixes marinhos contribuem em menor proporção com o volume produzido (7%, 5% e 3%, respectivamente). Entretanto, são itens alimentares com alto valor de mercado, o que os torna mais representativos em relação à receita. Os peixes diádromos corresponderam a 41% da receita total no ano de 2015, enquanto crustáceos contabilizaram 24% e peixes marinhos, 6% (FAO, 2017) (Figura 2).

Figura 1 – Produção mundial de pescado, em milhões de toneladas, por aquicultura e captura Adaptado de: FAO, 2016a.



Figura 2 – Divisão da receita da produção aquícola brasileira no ano de 2015 entre as diferentes modalidades de aquicultura, em relação ao volume de produção e à receita. Adaptado de: FAO, 2017.



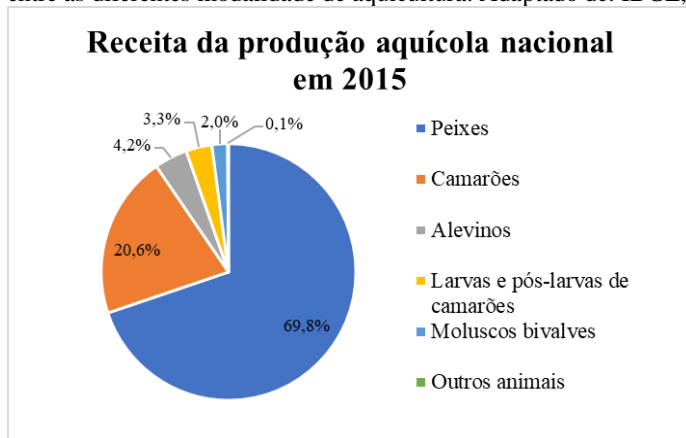
O país responsável pela maior produção de organismos aquáticos cultivados é a China, que forneceu 74,73% do volume total de produção da aquicultura no ano de 2015, com aproximadamente 61 milhões de toneladas e receita correspondente a 79 bilhões de dólares (FAO, 2017). Nas posições seguintes estão Indonésia (14,17% da produção mundial), Índia (4,83%), Vietnã (3,37%) e Filipinas (2,31%), considerando dados de produção do ano de 2014 (FAO, 2014). Atualmente a aquicultura é o setor de produção animal que apresenta desenvolvimento mais acelerado, com crescimento de 6,2% ao ano entre 2000 e 2012 (FAO, 2014). Considerando o contínuo aumento do consumo de pescado, a tendência é que a aquicultura seja responsável por suprir maior parte da demanda global por proteínas de origem animal nos próximos anos.

Aquicultura no Brasil

Segundo levantamento realizado em 2014, o Brasil atualmente ocupa a 12^o posição mundial em produção de organismos aquáticos cultivados (FAO, 2014). Entretanto, o país tem potencial para tornar-se um dos principais produtores mundiais, devido à abundância de recursos hídricos, condições ambientais favoráveis e ocorrência natural de espécies com alto potencial zootécnico e mercadológico. A piscicultura continental, a carcinicultura marinha e a malacocultura são os ramos mais desenvolvidos da aquicultura brasileira, baseadas principalmente em espécies exóticas ou não nativas, sendo praticadas em diversos ambientes, modalidades e estratégias de produção (BRABO et al., 2016). Em 2015, a aquicultura nacional produziu um total de 574.164 toneladas de pescado, avaliados em cerca de R\$ 4,4 bilhões. A maior parte desta receita vem da criação de peixes (69,9%), seguida pela carcinicultura (20,6%), enquanto a produção de moluscos contabiliza 2% deste total (IBGE, 2015).

A produção de peixes foi de 483,14 toneladas no ano de 2015, com receita aproximada de R\$ 3 bilhões. As espécies mais produzidas são a tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), que correspondem a 45,4% e 28,1% do volume de produção, respectivamente (IBGE, 2015). A produção de camarões corresponde majoritariamente ao cultivo do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*), que atingiu 65 mil toneladas em 2014. No mesmo ano, a produção de moluscos foi composta principalmente por mexilhões *Perna perna* (19 mil toneladas) e ostras do gênero *Crassostrea* (2800 toneladas) (FAO, 2016b).

Figura 3 – Divisão da receita da produção aquícola brasileira no ano de 2015 entre as diferentes modalidades de aquicultura. Adaptado de: IBGE, 2015.



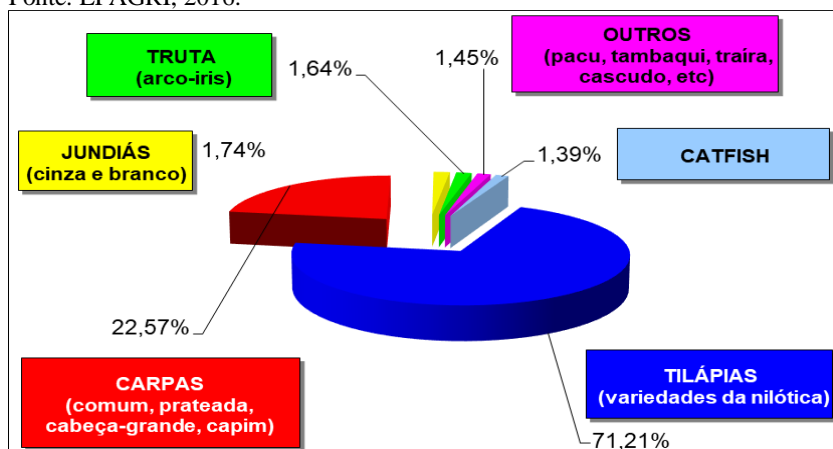
Aquicultura em Santa Catarina

A aquicultura catarinense foi responsável pela produção 63,5 mil toneladas de pescado no ano de 2015. O estado é líder de produção em malacocultura no Brasil, sendo responsável por 98,1% da produção nacional de moluscos bivalves em 2015 (IBGE, 2015). No mesmo ano, Santa Catarina foi o 4º maior produtor de peixes cultivados, precedido por Rondônia, Paraná e Mato Grosso do Sul (IBGE, 2015). A produção aquícola do estado é composta principalmente por peixes de água doce, que correspondem a 67,4% do volume de produção, seguidos por mexilhões (27,37%), ostras (4,77%), camarões (0,35%) e vieiras (0,06%) (EPAGRI, 2016).

Enquanto a produção da piscicultura nacional apresentou incremento de somente 1,8% em relação ao ano anterior, na região Sul, a produção aumentou 13,2% no mesmo período, indicando o alto potencial da região para esta atividade (IBGE, 2015). A produção catarinense tem importante participação neste cenário, com 42,7 mil toneladas produzidas no ano de 2015 e aumento de 23% nos últimos três anos (EPAGRI, 2012, 2016). Cultiva-se cerca de vinte espécies de peixes, sendo as tilápias (71,21% do volume de produção) e carpas (22,5%) as mais produzidas, correspondendo a 93,7% da produção total da piscicultura no estado (EPAGRI, 2016). Segundo a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri),

grande parte dos produtores comerciais catarinenses participam de cursos profissionalizantes e contam com disponibilidade de assistência técnica, o que contribui para o expressivo desenvolvimento da atividade no estado. A maior parte da produção da piscicultura catarinense é comercializada no mercado atacadista, principalmente para estabelecimentos do tipo pesque-pague (50% do volume de produção). A indústria absorve cerca de 30% da produção, e o mercado local, considerado varejo, 20% (SILVEIRA et al., 2015).

Figura 4 – Importância percentual das principais espécies de peixes produzidas pela piscicultura continental no estado de Santa Catarina em 2015. Fonte: EPAGRI, 2016.



Biologia e cultivo da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.)

As tilápias são peixes teleósteos pertencentes à família Cichlidae, correspondendo a cerca de 75 espécies válidas. São espécies nativas do continente africano e da Palestina e têm sido utilizadas na piscicultura desde 2000 a.C. Destas, somente quatro espécies têm atualmente destaque na piscicultura: tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.), tilápia-de-moçambique (*Oreochromis mossambicus* Peters, 1852), tilápia-azul (*Oreochromis aureus* Steindachner, 1864) e tilápia-de-zanzibar (*Oreochromis urolepis* Norman, 1922), além dos híbridos originários do cruzamento entre estas espécies (FAO, 2017).

A espécie mais cultivada é a tilápia-do-nilo (*O. niloticus*), que habita áreas tropicais e possui preferência por águas rasas. Apresenta ampla faixa de tolerância térmica que se estende de 11 a 42 °C. É

onívora e filtradora, alimentando-se de fitoplâncton, perifíton, plantas aquáticas, animais bentônicos, detritos e filmes bacterianos associados a estes. Em viveiros, podem atingir a maturidade sexual entre 5 e 6 meses de vida. O comportamento reprodutivo inclui a construção de ninhos escavados e territorialismo por parte dos machos. A desova ocorre no ninho, a temperaturas próximas de 24 ° C, e logo após a fertilização os ovos são coletados pela fêmea, que incuba os ovos na cavidade bucal. O processo de incubação e cuidado parental dura entre uma e duas semanas, dependendo da temperatura da água. Se não houver períodos de baixa temperatura, durante os quais a reprodução é suprimida, as desovas ocorrem continuamente ao longo do ano (FAO, 2005).

Devido às suas características biológicas, a espécie se adapta tanto ao cultivo extensivo, sem utilização de qualquer tecnologia, quanto ao sistema de criação intensivo, com rações comerciais e com alta tecnologia de produção (MEURER et al., 2002). Tilápias são consideradas peixes tropicais tolerantes a ampla faixa de temperatura, sendo que abaixo de 15 ° C o consumo de alimento é praticamente interrompido. Porém, peixes cultivados em temperaturas mais baixas não apresentam taxas expressivas de mortalidade quando são devidamente aclimatados, o que permite o cultivo em locais de inverno rigoroso, como a região Sul do Brasil. Apresenta bons resultados de crescimento entre 26 e 32 ° C, porém, obtém-se melhor desempenho zootécnico entre 26 e 28 ° C (ZANIBONI FILHO, 2004). São tolerantes a baixas concentrações de oxigênio dissolvido, sendo a concentração de 0,1 mg.L⁻¹ considerada letal para a espécie. Resistem também a uma ampla faixa de pH, suportando valores entre 5 e 11 sem qualquer efeito deletério, porém, os valores ideais estão entre 7 e 8. Apresentam também tolerância à salinidade, o que pode ser explicado por sua provável origem marinha e permite o cultivo em água salobra (ZANIBONI FILHO, 2004).

O potencial de criação da tilápia deve-se à sua resistência a diversas condições de qualidade de água, facilidade no manejo da criação, alta taxa de crescimento, adaptação às dietas comerciais, eficiência alimentar e rusticidade, além de pacote tecnológico já bem estabelecido e aceitação no mercado, com diversas possibilidade de processamento e comercialização. O grande interesse no cultivo de tilápias fez com que as espécies fossem disseminadas para diversas regiões tropicais e subtropicais, sendo que atualmente existem cultivos de tilápia em 135 países e territórios, em todos os continentes (FAO, 2014). A criação de tilápias, incluindo a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e outros ciclídeos, é a modalidade de aquicultura mais

difundida mundialmente. Esta espécie vem impulsionando a produção mundial de peixes dulcícolas, com aproximadamente 3,9 milhões de toneladas produzidas em 2015, correspondendo à receita de aproximadamente US\$ 6 bilhões e aumento de 20% nos últimos três anos (FAO, 2017). Em 2015, os maiores produtores de tilápia no mundo foram a China (1,3 milhões de toneladas e US\$ 1,9 bilhões), Indonésia (1 milhão de toneladas e US\$ 1,6 bilhões) e Egito (875 mil toneladas e US\$ 1,1 bilhões) (FAO, 2017). O Brasil encontra-se na posição de quinto maior produtor mundial de tilápias, com 219,33 mil toneladas despesadas em 2015 (IBGE, 2015).

Nos últimos anos a tilápia mantém-se como um produto muito popular no setor de varejo. Os Estados Unidos constituem o maior mercado importador, tendo países da Ásia e América Central como principais fornecedores de tilápia congelada e fresca, respectivamente (FAO, 2016a). No ano de 2015, foi a quarta espécie de peixe mais consumida nos Estados Unidos, com consumo per capita de aproximadamente 0,65 kg ao ano, cinco vezes mais do que no ano 2000 (FITZSIMMONS et al., 2014; NATIONAL FISHERIES INSTITUTE, 2015). Na Europa, a demanda de consumo permanece estável (FAO, 2014), enquanto a expansão da tilapicultura na Ásia, na América do Sul e na África impulsiona o consumo interno nestas regiões. Em muitos países, a tilápia está entre os peixes mais consumidos, garantindo a segurança nutricional da população em localidades menos desenvolvidas (PERSCHBACHER; STICKNEY, 2017).

A tilápia-do-nylo é também a espécie de peixe mais criada no Brasil, representando 45,4% da produção total da piscicultura e receita de R\$ 1,17 bilhões (IBGE, 2015). Na década passada, a produção nacional de tilápias ultrapassou a produção conjunta dos principais países exportadores de filé fresco de tilápia para o mercado norte-americano, como o Equador, Honduras, Costa Rica e Colômbia (KUBITZA, 2007). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015), em 2015 a produção total da piscicultura brasileira cresceu somente 1,88% em relação ao ano anterior, porém, a produção nacional de tilápia aumentou 9,7% no mesmo período. É preciso incrementar a produtividade a tendência a incremento do consumo per capita de tilápia no Brasil, que foi de 1,84 kg em 2016, representando aumento de 106% nos últimos três anos. A indústria brasileira de tilápia é majoritariamente voltada para o mercado interno, sendo que 99% da produção é consumida em território nacional. Os 1% restantes correspondem a menos de 200 toneladas e são exportados praticamente em sua totalidade para os Estados Unidos (BARROSO et al., 2017).

Em Santa Catarina, a tilápia é a espécie de peixe mais cultivada, representando cerca de 70% do volume de produção total da piscicultura no estado, com 30,3 toneladas produzidas no ano de 2015 e crescimento de 11% em relação ao ano anterior (EPAGRI, 2014, 2015). Segundo Kubitzka (2011), entre os fatores que contribuíram com o desenvolvimento da tilapicultura no Brasil está a melhoria na qualidade dos alevinos, através da reversão sexual e do uso de linhagens geneticamente melhoradas, como a tailandesa e, mais recentemente, a GIFT – (*Genetically Improved Farmed Tilapia*). A implantação da tecnologia de criação em tanques-rede possibilitou rápida expansão da criação em diversos estados, aproveitando a área disponível em reservatórios de água doce. Outros fatores importantes foram a agilidade da indústria de rações em elaborar linhas específicas para tilápias e a aprovação no mercado interno no país, devido à qualidade dos produtos de tilápia ofertados pelos frigoríficos e produtores. Entretanto, assim como ocorre com muitas outras espécies, o incremento da produção de tilápia vem sendo limitado pela ocorrência de enfermidades, especialmente bacterianas, devido a fatores decorrentes do cultivo intensivo.

Enfermidades na piscicultura

Na piscicultura mundial e nacional, o surgimento de novas tecnologias proporcionou o crescimento de cultivos intensivos, a fim de obter maior produtividade e suprir a crescente demanda por pescado (MARTINS et al., 2004a; TAKAHASHI, 2011). Entretanto, esta modalidade de cultivo está frequentemente ligada a inadequações que favorecem a ocorrência de enfermidades (YOUSEFIAN; AIMIRI, 2009; MORAES; MARTINS, 2004a), pois causam estresse aos organismos cultivados e comprometem suas defesas imunológicas, facilitando a ação dos patógenos e fazendo com que as enfermidades se manifestem (MARTINS, 2004b).

A intensificação dos sistemas de cultivo tem favorecido a ocorrência de enfermidades devido às condições de estresse impostas aos animais, associadas principalmente à deterioração da qualidade da água, alta densidade, falta de cuidados no manejo e dieta inadequada. Estes fatores de estresse comprometem as defesas imunológicas dos animais, fazendo com que as enfermidades se manifestem (MARTINS, 2004b). Organismos potencialmente patogênicos podem estar normalmente presentes na superfície do corpo, brânquias e órgãos internos, bem como na água, sem causar qualquer tipo de dano. Os

surtos de enfermidades acontecem quando aumenta a susceptibilidade do hospedeiro, normalmente sob as condições de estresse impostas pelo ambiente de cultivo (MORAES; MARTINS, 2004; PAVANELLI et al., 2008). As mortalidades causadas por estes surtos causam grandes prejuízos econômicos. Estima-se que as prejuízos relacionados a enfermidades na aquicultura correspondam a, no mínimo, US\$ 6 bilhões por ano (WORLD BANK GROUP, 2014). Considerando somente a produção de peixes, as perdas estão na faixa de 1,05 a 9,58 bilhões de dólares por ano (SHINN et al., 2015). No Brasil, estima-se que o prejuízo provocado direta e indiretamente por enfermidades na aquicultura é de cerca US\$ 84 milhões ao ano, desconsiderando os custos relacionados ao fármacos utilizados para profilaxia e tratamento (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). A dificuldade de quantificar estes prejuízos com exatidão está na escassez de informações precisas sobre a morbidade, mortalidade e custos relativos à produção. As enfermidades podem causar prejuízos não somente por mortalidade, mas também por interferir no desempenho reprodutivo e prejudicar a conversão alimentar e ganho de peso dos peixes (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017).

As enfermidades bacterianas, comumente de caráter sistêmico, costumam causar altas taxas de mortalidade na piscicultura (PAVANELLI et al., 2008). Os principais agentes causadores de enfermidades em pisciculturas brasileiras são as bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, que causam a estreptococose, septicemia hemorrágica e columnariose, respectivamente (FIGUEIREDO et al., 2006; FIGUEIREDO; LEAL, 2008; PILARSKI et al., 2008). Porém, os peixes são susceptíveis a uma ampla gama de organismos patogênicos, incluindo bactérias, parasitos, fungos e vírus (AL-HARBI, 2016), que estão inevitavelmente presentes no ambiente aquático. Diante deste cenário, torna-se essencial a execução de boas práticas de manejo, assim como a busca por produtos seguros que auxiliem na prevenção e tratamento de enfermidades em peixes cultivados.

Infecções causadas por *Streptococcus agalactiae*

Dentre as doenças infecciosas que acometem peixes em cultivo, a septicemia causada por bactérias do gênero *Streptococcus* está entre as principais causas de enfermidade, especialmente em criações de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (EVANS et al., 2002). As bactérias do gênero *Streptococcus* são cocos Gram-positivos, medem

aproximadamente 1 µm de diâmetro, formam cadeias, são catalase-negativas, anaeróbias facultativas e imóveis (ROBERTS, 2012). As estreptococoses são infecções septicêmicas que afetam uma ampla gama de peixes de água doce e marinhos, de ambiente natural ou de cultivo (AUSTIN; AUSTIN, 2013). Ao longo da última década, infecções causadas por estreptococos vêm provocando perdas econômicas significativas na piscicultura mundial, constituindo um dos maiores entraves para o crescimento da produção. Dentre os estreptococos que acometem peixes cultivados, *Streptococcus agalactiae* tem sido responsável por surtos de mortalidade em várias espécies, dulcícolas e marinhas, em ambiente natural e em pisciculturas de diversas regiões do mundo (AL-HARBI, 2016).

Streptococcus agalactiae é classificada como estreptococo grupo B, de acordo com o sistema de agrupamento de Lancefield. Agente infeccioso amplamente conhecido por causar septicemia neonatal em humanos e mastite em bovinos, vem se mostrando um patógeno emergente na piscicultura. No Brasil, *S. agalactiae*, também tem sido responsável por perdas econômicas expressivas no setor, em diversas regiões do país (MIAN et al., 2009).

Surtos de mortalidade devido à infecção por *S. agalactiae* já foram relatados em pisciculturas de diversos países, incluindo Arábia Saudita (AL-HARBI, 2016), Brasil (SALVADOR et al., 2005; MIAN et al., 2009), China (YE et al., 2011; CHEN et al., 2012; WANG et al., 2013; LI et al., 2014), Colômbia (HERNANDEZ et al., 2009; BARATO et al., 2015), Indonésia (LUSIASTUTI et al., 2014), Malásia (MUSA et al., 2009; ABUSELIANA et al., 2010) e Tailândia (SUANYUK et al., 2008; JANTRAKAJORN et al., 2014; KAYANSAMRUJ et al., 2014). Entre as espécies aquáticas acometidas, estão a carpa dourada (*Notemigonus crusoleucas*, Cyprinidae) (ROBINSON; MEYER, 1966), a savelha-do-golfo (*Brevoortia patronus*, Clupeidae), o bagre *Arius felis* (Ariidae), a tainha *Mugil cephalus* (Mugilidae), o esparídeo *Lagodon rhomboides* (Sparidae), a corvina-do-Atlântico (*Micropogonias undulatus*, Sciaenidae), o cienídeo *Leiostomus xanthurus* (Sciaenidae), raias do gênero *Dasyatis* (Dasyatidae), truta prateada (*Cynoscion nothus*, Sciaenidae) (PLUMB et al., 1974), o fundúlídeo *Fundulus grandis* (Fundulidae) (RASHEED; PLUMB, 1984), anchova (*Pomatomus saltatrix*, Pomatomidae), robalo-riscado (*Morone saxatilis*, Moronidae), tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*, Cichlidae) (SALVADOR et al., 2005; MIAN et al., 2009; WANG et al., 2013; LI et al., 2014; LUSIASTUTI et al., 2014), tilápia híbrida (*Oreochromis* sp., Cichlidae) (AL-HARBI, 2016), o ciprinídeo *Schizothorax prenanti*

(Cyprinidae) (GENG et al., 2011), garoupa (*Epinephelus lanceolatus*, Serranidae), perca (*Scortum barcoo*, Terapontidae) (LIU et al., 2014) e camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) (HASSON et al., 2009).

Além de peixes e crustáceos, *S. agalactiae* também causa infecções em mamíferos aquáticos, como o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) selvagem (EVANS et al., 2002) e de cativeiro (ZAPPULLI et al., 2005), em rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) de cultivo (AMBORSKI et al., 1983) e em crocodilos-marinhos (*Crocodylus porosus*) também de cultivo (BISHOP et al., 2007). Porém, sua patogenicidade não se restringe a espécies aquáticas, acometendo também bovinos, cães, gatos (BROCHET et al., 2006; SØRENSEN et al., 2010) e humanos (EVANS et al., 2009). É um microrganismo relevante na medicina, estando frequentemente associado a infecções neonatais, septicemia, pneumonia e meningite, associadas a morbidade e mortalidade (SCHRAG et al., 2002).

Diversos estudos também relatam alta susceptibilidade da tilápia à infecção por *S. agalactiae*. Surtos de mortalidade por *S. agalactiae* em tilápias têm sido registrados em diversos países, sendo a espécie mais seriamente afetada em todo o mundo (AL-HARBI, 2016). Os sinais clínicos típicos da infecção incluem septicemia, exoftalmia, opacidade na córnea, melanose, natação errática, aumento de volume e hemorragia nos órgãos internos (CHEN et al., 2012; LI et al., 2014). É uma infecção de rápida evolução e provoca altos índices de mortalidade, com morte de dois a três dias após o início dos sinais clínicos (FIGUEIREDO et al., 2006). Colônias isoladas de casos clínicos humanos foram capazes de causar enfermidade e morte em tilápias-do-nilo, o que evidencia a possibilidade de transmissão entre mamíferos e peixes (EVANS et al., 2009). Portanto, a infecção por *S. agalactiae* apresenta potencial zoonótico, o que compromete também a segurança alimentar relacionada ao consumo do pescado. Sua alta patogenicidade deve-se à capacidade de transpor a barreira hemato-encefálica do hospedeiro, causando meningoencefalite, processo inflamatório que acomete o cérebro e as meninges (PEREIRA et al., 2010).

Para controle da estreptococose na piscicultura, faz-se uso de rações medicadas com antibióticos. No entanto, este tratamento é pouco eficaz quando o problema é diagnosticado tardiamente. Em casos de infecção avançada, os peixes deixam de se alimentar, limitando o resultado do tratamento (KUBITZA, 2001). A baixa variedade de sorotipos de *S. agalactiae* permitiu o desenvolvimento de uma vacina já está comercialmente disponível, porém, sua aplicação inclui custos e

demanda manejo dos animais, além de ser indicada somente para peixes com mais de 15g (PRIDGEON; KLESIUS, 2013). A vacina apresenta, ainda, a limitação de proteger especificamente contra uma única enfermidade, enquanto o uso profilático de substâncias imunomoduladoras pode capacitar o organismo a combater uma ampla gama de agentes etiológicos (DÜGENCI et al., 2003).

Tratamentos de infecções na piscicultura

A expansão da aquicultura comercial levou à necessidade de utilização de medicamentos para prevenção e tratamento de enfermidades, a fim de garantir animais saudáveis e maximizar a produção. A movimentação indiscriminada de organismos aquáticos proporciona disseminação de patógenos com potencial para causar sérios prejuízos em criações (FAO, 2012). A disponibilidade de antibióticos sintéticos possibilita o controle de diversas infecções em peixes cultivados, porém, seu uso indiscriminado tem contribuído para a seleção de microrganismos patogênicos resistentes a este tipo de tratamento (OIE, 2016). Diversos antibióticos são também administrados via dieta como promotores de crescimento, causando os mesmos efeitos prejudiciais (SHAKYA et al., 2015).

Atualmente, poucos antibióticos são legalmente aprovados para uso na aquicultura e diversos países recusam a importação de pescado tratado com antibióticos sintéticos (GASTALHO et al., 2014). A presença de resíduos de antibióticos em produtos de origem animal destinados a consumo humano representa riscos à saúde do consumidor, incluindo reações alérgicas, toxicidade, alterações na flora intestinal e seleção de microrganismos resistentes. O reconhecimento destes riscos levou à necessidade de definir de regulamentos sobre o uso de antimicrobianos na produção animal e os limites máximos de resíduos (LMR) para determinados produtos. O Brasil não possui LMR definido para resíduos de medicamentos em produtos de origem animal, adotando os níveis de segurança recomendados pela legislação internacional, incluindo recomendações do Mercosul, Codex Alimentarius, União Europeia e FDA (*Food and Drug Administration*), agência responsável por medidas de segurança alimentar nos Estados Unidos (PACHECO-SILVA et al., 2014).

As especificação legais para o uso de antibióticos na aquicultura são regulamentadas por cada país, ou por acordos regionais, como é o caso da União Europeia. No Brasil, os antibióticos comerciais registrados no Compêndio de Produtos Veterinários do Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e autorizadas para uso na aquicultura são à base de florfenicol e oxitetraciclina para peixes de consumo, além da neomicina, autorizada somente para peixes ornamentais (SINDAN, 2015). Porém, na prática, são empregadas muitas outras substâncias de forma indiscriminada e sem conhecimento dos potenciais riscos à saúde humana, dos peixes e do ecossistema aquático (PÁDUA et al, 2012).

A intervenção terapêutica na piscicultura possui diversos entraves e, muitas vezes, é aplicada sem sucesso (REINCHENBACH-KLINKE, 1982). Em ambientes aquáticos, o uso de produtos sintéticos pode ocasionar grande impacto, associado principalmente à seleção de patógenos resistentes e à deposição de resíduos químicos na água (FIGUEIREDO; LEAL, 2008) e na carne do animal destinado à alimentação humana. Compostos sintéticos, como hormônios e antibióticos, são também utilizados como aditivos alimentares na aquicultura. Apesar do efeito promotor de crescimento, trazem os mesmos inconvenientes em relação à toxicidade e à seleção de patógenos resistentes (LARA-FLORES et al., 2003). É essencial preservar a eficácia dos antibióticos para garantir a continuidade de seu uso na medicina humana e veterinária. O aumento na frequência de surgimento de patógenos resistentes a antibióticos compromete seriamente a possibilidade de tratar infecções com sucesso no futuro (OIE, 2016). Existe, ainda, a possibilidade de que bactérias com resistência a determinado antibiótico transfiram genes de resistência para outras bactérias presentes no mesmo ambiente, o que torna o risco ainda maior (FAO, 2012). Esta problemática resulta na necessidade de investigar métodos alternativos para prevenção e tratamento de enfermidades em cultivo.

Uso de produtos naturais na piscicultura

Considerando as desvantagens relacionadas ao uso de produtos sintéticos, há crescente interesse no uso de produtos naturais para prevenção e tratamento de enfermidades na aquicultura, a fim de evitar os efeitos prejudiciais do uso de produtos sintéticos e garantir maior segurança alimentar (SHAKYA et al, 2015; AWAD; AWAAD, 2017).

Produtos naturais são substâncias produzidas por organismos vivos, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais (ORHAN, 2014). Podem apresentar atividade biológica e suas aplicações terapêuticas incluem tanto o tratamento quanto a prevenção de enfermidades. Plantas que possuem compostos de interesse terapêutico são amplamente

utilizadas na medicina humana e vêm despertando interesse para a aquicultura, por serem produtos mais seguros em relação aos produtos sintéticos convencionalmente utilizados. Neste sentido, as principais vantagens são a menor toxicidade, menor impacto ambiental relacionado à contaminação de corpos d'água, diminuição dos resíduos químicos na carne dos animais, menor risco de seleção de patógenos resistentes e menor custo financeiro ao produtor (COIMBRA et al., 2006).

As plantas sintetizam diversos componentes imunologicamente ativos por meio de seu metabolismo secundário, tais como polissacarídeos, ácidos orgânicos, alcalóides, glicosídeos, óleos voláteis, entre outros compostos capazes de incrementar as funções imunitárias em animais. Os extratos vegetais geralmente contêm pelo menos um composto com atividade antimicrobiana e vêm se destacando como substâncias de efeito imunomodulador (KOTZEKIDOU et al., 2007). Imunomoduladores são compostos capazes de interferir nos mecanismos imunológicos, podendo o efeito ser estimulatório ou inibitório, conduzindo o organismo a um estado mais saudável. Diversos produtos naturais têm ação comprovada sobre o funcionamento do sistema imunológico, conferindo ativação precoce para os mecanismos de defesa não-específicos e incremento na resposta imune específica de peixes. Os imunomoduladores são capazes de, simultaneamente, estimular alguns mecanismos de defesa e suprimir outros (NUNES-PINHEIRO et al., 2003), aumentando a resistência do animal a doenças infecciosas e parasitárias (BRICKNELL; DALMO, 2005). Este efeito ocorre pelo aumento da imunocompetência, que é a capacidade do sistema imune de ativar rapidamente seus mecanismos de defesa frente a um patógeno. Os compostos de origem vegetal podem possuir, além de atividade antimicrobiana e anti-helmíntica, propriedades imunomoduladoras, ativando defesas imunológicas específicas e inespecíficas nos peixes, o que resulta em proteção precoce contra infecções (SAKAI, 1999; CHAKRABORTY; HANCZ, 2011). Estes compostos podem inibir ou ativar componentes do sistema imunológico dos peixes, podendo auxiliar na fagocitose, incrementar a atividade bactericida dos compostos produzidos pelos fagócitos, estimular a atividade de linfócitos, do sistema complemento, da lisozima e de anticorpos, entre outros efeitos, proporcionando maior proteção contra infecções (HARIKRISHNAN et al., 2011)

Mundialmente, existe crescente interesse na aplicação de princípios ativos vegetais como imunomoduladores na aquicultura (GOVIND et al., 2012; BULFON et al., 2015; AWAD; AWAAD, 2017), pois podem ser utilizados de modo profilático durante períodos

críticos do ciclo produtivo, como por exemplo a larvicultura, ou manejos de classificação, transporte ou vacinação, quando os animais se tornam mais suscetíveis a agentes infecciosos (BRICKNELL; DALMO, 2005). Podem ser utilizados para complementar a vacinação, aumentando sua eficácia (JENEY; ANDERSON, 1993). A administração destes produtos pode ser feita via injeção, imersão, ou suplementação dietária. O método mais utilizado é via dieta, devido à sua praticidade, enquanto o método de injeção também é vantajoso por proporcionar melhor absorção e efeito, porém, trabalhoso (CHAKRABORTY; HANCZ, 2011).

Diversos estudos vêm relatando sucesso no uso de extratos vegetais para prevenção e tratamento de enfermidades em peixes (FAO, 2012). Na China, país responsável por 60% da produção mundial de peixes de água doce no ano de 2015 (FAO, 2017), fitoterápicos são frequentemente utilizados para controle das enfermidades em cultivo e possuem eficácia comprovada por diversos estudos (FAO, 2012). As plantas medicinais constituem importante fonte de compostos bioativos para prevenção e tratamento de enfermidades na aquicultura, sendo que os estudos realizados até o momento têm demonstrado redução dos efeitos nocivos à saúde humana, animal e ambiental, em relação a produtos sintéticos (CHU et al., 2010). Resultados positivos têm sido obtidos em relação ao controle de parasitos protozoários, helmintos e crustáceos (KUMAR et al., 2011; WU et al., 2011; ZHANG et al., 2013) e de bacterioses, como as causadas por *Aeromonas* sp., *Flavobacterium* sp. e *Streptococcus* sp. (ZHENG et al., 2009; ALSAID et al., 2010; MEEPAGALA et al., 2013) em peixes.

Manjeriço-cravo (*Ocimum gratissimum*)

Plantas do gênero *Ocimum* (Família Lamiaceae), popularmente denominadas de manjeriços, pertencem a um grupo economicamente importante de vegetais herbáceos que se distribuem pelas áreas tropicais da África, América e Ásia (ORAFIDIYA et al., 2004). Trinta espécies são reconhecidas e ocorrem principalmente em regiões quentes, ocorrendo desde o nível do mar até 1800 m de altitude, sendo a África, América do Sul (Brasil) e Ásia os locais com maior diversidade de espécies do gênero *Ocimum* (PATON et al., 1999). As espécies destes gênero contêm óleos essenciais ricos em constituintes de interesse comercial, amplamente utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. A demanda por estes compostos tende a se tornar ainda

maior, devido à crescente restrição do uso de aromatizantes artificiais na indústria (NOLASCO, 1996).

Estas espécies possuem propriedades terapêuticas comprovadas para humanos e animais, inclusive peixes. Em garoupas (*Epinephelus tauvina*) tratadas com manjeriço-santo (*Ocimum sanctum*) em pó na ração, observou-se incremento no desempenho zootécnico, parâmetros imunológicos e resistência à infecção por *Vibrio harveyi* (SIVARAM et al., 2004). O extrato aquoso da mesma espécie de manjeriço proporcionou redução da glicemia em tilápias-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) hiperglicêmicas, quando administrado em forma de banho. O óleo essencial de manjeriço-branco (*Ocimum americanum*) mostrou atividade imunostimulante *in vitro*, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em leucócitos sanguíneos e em macrófagos isolados do rim cefálico do peixe marinho *Sciaenops ocellatus* (Sciaenidae) (SUTILI et al., 2016). Em carpa-comum (*Cyprinus carpio*), o extrato etanólico de manjeriço-de-folha-larga (*Ocimum basilicum*) fornecido via dieta durante 60 dias melhorou o crescimento, conversão alimentar e sobrevivência à infecção por *Aeromonas hydrophila* (AMIRKHANI; FIROUZBAKSHI, 2013). O óleo essencial de *O. basilicum* também se mostrou eficaz como anestésico para o híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) (LIMMA-NETTO et al., 2016).

Ocimum gratissimum L., popularmente conhecida como manjeriço, manjeriço-cravo ou alfavaca, é originária da Ásia e África e subespontânea em todo o território brasileiro (LORENZI; MATOS, 2002). É um arbusto lenhoso, podendo atingir altura de até 1,9 m. As folhas medem até 10 x 5 cm, com formato variando entre oval e oval-lanceolado, ápice acuminado a sub-acuminado, com bordas grosseiramente serrilhadas, pubescentes e pontilhadas em ambas as faces (PRABHU et al., 2009). Suas folhas e flores são ricas em óleos essenciais, misturas complexas que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos (WATERMAN, 1993), normalmente voláteis aromáticos que conferem odor característico à planta (MATOS, 1998).

Além de servir como condimento na alimentação humana, o manjeriço-cravo é também vastamente conhecido e utilizado por suas propriedades terapêuticas. Estudos anteriores relatam atividade anestésica, antiestresse, anti-cefaléia, antidiarreica, anti-helmíntica, anti-inflamatória, antimutagênica, antipirética, antiulcerativa, gastroprotetora, fungicida, hepatoprotetora e sedativa para esta espécie de manjeriço, confirmando suas aplicações medicinais populares (DI

STASI et al., 2002; AKAH et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007; PRABHU et al., 2009; ZAMIN, 2011).

Diversos produtos de origem vegetal apresentam atividade antimicrobiana, devido à sua capacidade de romper a parede celular bacteriana, bloquear a síntese de proteínas e DNA, inibir a produção de enzimas e interferir no mecanismo de sinalização via *quorum sensing* (CITARASU, 2010). A atividade antimicrobiana do óleo essencial encontrado nas folhas de *O. gratissimum* espécie tem sido verificada sobre organismos de elevada patogenicidade, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp, *Pseudomonas aeruginosae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Leishmania amazonensis* (UEDA-NAKAMURA et al., 2006; MATASYOH et al., 2007). Com relação aos patógenos que ocorrem na piscicultura, o extrato metanólico e o óleo essencial de folhas de manjerição-cravo já demonstraram atividade antimicrobiana *in vitro* contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*, que causa infecção e mortalidade em peixes cultivados (HANIFFA; KAVITHA, 2012; SUTILI et al., 2015). O óleo essencial também possui atividade inibitória *in vitro* contra bactérias patogênicas isoladas de jundiá (*Rhamdia quelen*), como *Aeromonas veronii*, *Citrobacter freundii*, *Raoltella ornithinolytica*, além do parasito monogenético *Gyrodactylus* sp. (BANDEIRA JR., 2017).

Produtos de origem vegetal, como os óleos essenciais são conhecidos por desempenhar um papel importante na saúde animal, pois contêm substâncias bioativas com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antiestresse, promotoras de crescimento, estimulantes de apetite e imunomoduladoras (FRANZ et al., 2010; CHANU et al., 2012; BENTO et al., 2013). Testes *in vivo* com roedores demonstram propriedades biológicas do óleo essencial de manjerição-cravo. Em camundongos (*Mus musculus*) que receberam este óleo em dose única por via oral (10-40 mg/kg), houve efeito antinociceptivo durante testes de dor com injeção de formalina, combatendo a dor tanto de origem neurogênica quanto inflamatória (PAULA-FREIRE et al., 2013). O óleo essencial de manjerição-cravo também apresentou atividade vasorelaxante em ratos (*Rattus norvegicus*), quando administrado em forma de injeção (PIRES et al., 2012).

Diversos estudos demonstram a aplicabilidade de produtos derivados do manjerição-cravo (*Ocimum gratissimum*) na piscicultura. Em bagres-africanos (*Clarias gariepinus*) cuja dieta foi suplementada com folhas de *O. gratissimum* em pó durante 56 dias, houve melhoria na composição de carcaça, sendo que a carne apresentou maior teor de umidade, proteínas e lipídios (ANYANWU et al., 2012). O extrato bruto

de *O. gratissimum* também se mostrou eficaz em reduzir a infestação pelo crustáceo ectoparasito *Argulus* sp. em tilápia-do-nylo (*O. niloticus*) quando aplicado em forma de banho de imersão, além de atividade *in vitro* sobre o parasito (KONE et al., 2013).

O óleo essencial de manjerição-cravo também apresenta resultados positivos na saúde dos peixes. Quando em forma de banho durante 15 minutos, mostrou atividade antiparasitária em tambaquis (*Colossoma macropomum*) parasitados por *Monogenea* nas brânquias (BOIJINK et al., 2016). Este óleo também ameniza a hemólise em eritrócitos de jundiá (*Rhamdia quelen*) expostos a *A. hydrophila in vitro*. Este mesmo estudo realizou testes *in vivo*, onde jundiás experimentalmente infectados com *A. hydrophila* foram tratados com óleo essencial de manjerição-cravo em forma de banhos de imersão, com duração de 1 h, durante 5 dias. Os peixes tratados mostraram aumento significativo na taxa de sobrevivência à infecção (SUTILI et al., 2015). Jundiás tratados com óleo essencial de *O. gratissimum* em forma de banho durante 48 h mostraram maior atividade de enzimas antioxidantes no tecido hepático e renal (BANDEIRA JR., 2017).

Em estudos realizados com linguado (*Paralichthys orbignyanus*), jundiá (*Rhamdia quelen*), tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), matrinxã (*Brycon amazonicus*), e o peixe marinho *Stegastes nigricans* (Pomacentridae) a exposição ao óleo essencial de *O. gratissimum* proporcionou anestesia efetiva sem efeitos colaterais ou mortalidade, sendo considerado um anestésico eficaz e seguro (MARTIN et al., 2011; BENOVIĆ et al., 2012; SILVA et al., 2012, 2013, 2015; RIBEIRO et al., 2016; ADEWALE et al., 2017). Por fim, o óleo essencial de *O. gratissimum* acrescido à dieta de juvenis de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) proporcionou melhoria na taxa de crescimento, na conversão alimentar e na atividade fagocitária dos leucócitos contra *Streptococcus agalactiae* (BRUM et al., 2017). Estes dados mostram que a utilização do óleo essencial de manjerição como terapêutico na piscicultura é promissora, porém, é necessário esclarecer sobre o efeito integrado deste óleo na dieta sobre parâmetros hemato-imunológicos, bioquímicos e histológicos em peixes.

Gengibre (*Zingiber officinale*)

O gengibre (*Zingiber officinale* Rosc., família Zingiberaceae) é uma planta herbácea originária do Sudeste da Ásia, que difundiu-se pelas áreas tropicais de todos os continentes. Pode atingir mais de 1 metro de altura, possuindo rizoma articulado, rastejante, anguloso,

ramoso, achatado, carnoso e revestido de epiderme rugosa e pardacenta. As folhas são dispostas em duas fileiras, sendo as basilares simples bainhas sem pelos e estriadas no sentido longitudinal. As flores são organizadas em inflorescências com espigas ovóides, são hermafroditas e de coloração amarelo-esverdeada, e o fruto consiste numa cápsula que se abre em três lóculos, com sementes azuladas e albúmen carnoso (FERRI et al., 1981). É uma planta mundialmente utilizada com fins medicinais, inclusive no tratamento de enfermidades parasitárias e infecciosas. Diversas pesquisas científicas visam o isolamento e identificação dos princípios ativos do gengibre, bem como suas ações farmacológicas e seu potencial de utilização no tratamento de enfermidades (ALI et al., 2008). Compostos presentes no rizoma do gengibre apresentam atividade antiagregante plaquetária, antibacteriana, antifúngica, anti-hiperglicêmica, antitumoral, antilipidêmica, antiviral, antiinflamatória e antioxidante, proporcionando efeitos benéficos sobre diversos órgãos e tecidos. É conhecido principalmente por modular a resposta imune e proporcionar resistência a doenças, em humanos e animais, inclusive peixes (NYA; AUSTIN, 2009; APINES-AMAR et al., 2012; TALPUR et al., 2013; SHAKYA et al., 2015).

Os efeitos *in vivo* do óleo essencial de gengibre são documentados em diversos estudos com roedores. Em camundongos com quadro de nefrotoxicidade induzido por injeção de cisplatina, a administração de óleo essencial de gengibre via gavagem (100-400 mg/kg/dia) durante quatro dias atenuou significativamente os danos no tecido renal. Este efeito possivelmente ocorre por modulação de determinadas citocinas que participam da resposta inflamatória (DAMIÃO et al., 2013). Há também estudos que demonstram a segurança da administração deste óleo em dietas para animais. Em camundongos que receberam óleo essencial de gengibre (até 500 mg/kg/dia) por via oral durante 13 semanas, não foram observados sinais clínicos de toxicidade, considerando parâmetros hematológicos, função hepática e renal, eletrólitos do soro e histologia de órgãos internos (JEENA et al., 2011). O óleo essencial de gengibre (e seu principal componente, citral, administrados oralmente durante quatro semanas proporcionaram efeito hepatoprotetor e antioxidante em camundongos (*M. musculus*) com doença hepática gordurosa não-alcoólica (LIU et al., 2013).

Em camundongos cuja dieta foi suplementada durante 12 semanas com óleo essencial de gengibre (12,5-125 mg/kg/dia) e seu principal componente, citral (2,5-25 mg/kg/dia), houve redução da ocorrência de obesidade e dos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos

e ácidos graxos livres. Houve, ainda, redução do acúmulo de gordura no tecido hepático e inibição da resposta inflamatória (LAI et al., 2016). Em ratos (*Rattus norvegicus*) com úlcera gástrica induzida por ingestão de etanol, o tratamento com óleo essencial de gengibre via gavagem durante sete dias aumentou a atividade de enzimas antioxidantes no estômago e amenizou significativamente as lesões provocadas pelo etanol (LIJU et al., 2014). A administração oral de óleo essencial de gengibre durante 30 dias (mg/kg/dia) a camundongos (*M. musculus*) aumentou a atividade de enzimas antioxidantes no sangue e no fígado, além de inibir resposta inflamatória aguda produzida por injeção de carragenina (JEENA et al., 2013).

Com relação aos peixes, estudos mostram que o gengibre pode atuar como promotor de crescimento. A suplementação dietária com gengibre em pó durante oito semanas proporcionou melhoria no desempenho zootécnico em carpa-comum (*Cyprinus carpio*) (ABBASI-GHADIKOLAEI et al., 2017). Melhorias no crescimento também foram relatadas para carpa-comum suplementada com gengibre em pó durante 30 dias, além de aumento na capacidade cognitiva e na sobrevivência à infecção por *Aeromonas hydrophila* (KORNI; KHALIL, 2017). Em esturjões (*Huso huso*), a suplementação dietária com gengibre em pó durante 60 dias proporcionou melhoria na taxa de crescimento específico, no ganho de peso e no fator de condição (KANANI et al., 2014). O gengibre em pó adicionado à dieta durante oito semanas também proporcionou melhoria na qualidade da carne em carpa-comum (*Cyprinus carpio*), com aumento no teor de carboidrato e redução no teor de fibras (ABBASI-GHADIKOLAEI et al., 2017).

O gengibre vem demonstrando diversos efeitos no sistema imunológico e no estado fisiológico geral dos peixes. Em ensaio com robalo asiático (*Lates calcefer*), a suplementação dietária com gengibre em pó durante 15 dias promoveu incremento em parâmetros hematológicos e maior taxa de sobrevivência em infecção experimental com *Vibrio harveyi* (TALPUR et al., 2013). Em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a suplementação com gengibre em forma de extrato aquoso liofilizado durante três semanas proporcionou aumento de células fagocíticas no sangue, incrementando a capacidade de defesa não-específica (DÜGENCI et al., 2003). Em bagres-africanos (*Clarias gariepinus*) que receberam dieta com gengibre em pó durante quatro meses, o muco apresentou maior atividade antimicrobiana contra as bactérias *Bacillus* sp., *Escherichia* sp., *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. (NWABUEZE, 2014).

Trutas-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com gengibre em pó durante 10 dias mostraram incremento em parâmetros relacionados à resposta imune inata, como a contagem de leucócitos no sangue, hematócrito, número de eritrócitos, atividade respiratória de leucócitos e atividade da lisozima (HAGHIGHI; ROHANI, 2013). Em outro estudo com truta arco-íris (*O. mykiss*), confirmam-se as propriedades imunoestimulantes do gengibre em pó, fornecido na dieta por 14 dias, que reduziu a mortalidade a 0% em desafio com *Aeromonas hydrophila* (NYA; AUSTIN, 2009). Este estudo demonstrou também que o gengibre pode atuar como promotor de crescimento, corroborando o resultado encontrado em garoupas *Epinephelus tauvina* após 60 dias de alimentação contendo extrato de *Z. officinale* (PUNITHA et al., 2008). Trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) que receberam dieta suplementada com gengibre em pó por 14 dias apresentaram aumento significativo no crescimento, melhoria na conversão alimentar e na eficiência proteica (NYA; AUSTIN, 2009). Dietas suplementadas com extrato acetônico de gengibre durante 45 dias proporcionaram melhoria no crescimento em tilápia-de-moçambique (*Oreochromis mossambicus*), além de incrementar parâmetros bioquímicos do soro e a sobrevivência à infecção por *Vibrio vulnificus* (IMMANUEL et al., 2009). Também foi observado incremento no número de eritrócitos e no hematócrito de esturjões (*Huso huso*) cuja dieta foi suplementada com gengibre em pó durante 60 dias (KANANI et al., 2014). Em robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) exposto a banho de imersão com óleo de gengibre durante 96 h, não houve efeito negativo sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do soro até a concentração de 0,02 mL.L⁻¹, podendo esta dose ser utilizada com segurança para fins terapêuticos (YILMAZ; ERGÜN, 2012).

Em ensaio com tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) a suplementação com gengibre em pó durante seis semanas proporcionou incremento em valores hematológicos e bioquímicos, indicando melhoria no estado fisiológico destes peixes (ANTACHE et al., 2014). Corroborando este estudo, tilápias (*O. niloticus*) cuja dieta foi suplementada com gengibre em pó por 10 semanas mostraram maior ganho de peso, taxa de crescimento e melhor conversão alimentar, além de incremento nas imunoglobulinas, na atividade da lisozima e na sobrevivência à infecção por *Aeromonas hydrophila* (HASSANIN et al., 2014). O gengibre em pó adicionado à dieta durante 12 semanas proporcionou redução dos níveis de cortisol, efeito protetor no tecido hepático e renal, incremento na concentração de imunoglobulinas, na produção de espécies reativas de oxigênio e na atividade da lisozima sérica no soro, além de maior

sobrevivência à infecção por *Vibrio harveyi* em garoupas (*Epinephelus fuscoguttatus*) (APINES-AMAR et al., 2012, 2013).

O gengibre já demonstrou também atividade antiparasitária em peixes. Em carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*), banhos de imersão com extrato aquoso de gengibre auxiliaram na redução da intensidade de parasitismo pelo protozoário *Ichthyophthirius multifiliis* e pelo monogenético *Dactylogyruis ctenopharyngodonid* (FU et al., 2017). Em outros estudo com carpa-capim (*C. idella*), a suplementação dietária com extrato etanólico de gengibre durante apenas três dias proporcionou redução no parasitismo por *I. multifiliis* (LIN et al., 2016). Em lebiste (*Poecilia reticulata*), extrato aquoso e etanólico de gengibre administrados em forma de banho de imersão durante 30 minutos foram eficazes contra o parasito monogenético *Gyrodactylus turnbulli* (LEVY et al., 20015). O óleo essencial de gengibre adicionado à dieta de tilápia-no-nilo mostrou efeito imunomodulador, aumentando a atividade fagocitária dos leucócitos contra a bactéria *Streptococcus agalactiae* (BRUM et al., 2017), principal causa de perdas na tilapicultura. A implantação de programas adequados de prevenção e controle de enfermidades pode maximizar a produção animal, com menor custo e impacto em relação às práticas convencionais.

JUSTIFICATIVA

Para acompanhar o expressivo desenvolvimento da aquicultura, é necessário investigar e estabelecer medidas terapêuticas para a prevenção e controle de enfermidades, pois estas constituem a principal causa de perdas econômicas neste setor. Os produtos utilizados para tratamento de enfermidades na aquicultura são geralmente sintéticos, com alto custo para o produtor e alta toxicidade. Consequentemente, podem ser agressivos aos próprios animais tratados, além de contaminar a carne destinada ao consumo humano e a água, que será liberada para o ambiente natural. Esta problemática é minimizada com a utilização de produtos naturais, que apresentam menor toxicidade e maior potencial de biodegradação, além do menor risco de seleção de patógenos resistentes. A administração de compostos imunomoduladores, como os óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale*) e manjerição (*Ocimum gratissimum*), vastamente conhecidos por suas propriedades terapêuticas, pode tornar o animal mais capacitado a combater agentes patogênicos. Considerando o impacto econômico das doenças infecciosas na piscicultura, este estudo visa investigar alternativas para minimizar estas perdas, bem como os prejuízos sanitários e ambientais da utilização de fármacos sintéticos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a influência da suplementação dietária com óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e de *Zingiber officinale* sobre o desempenho zootécnico, parâmetros hemato-imunológicos, histológicos e resistência à infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

Objetivos Específicos

- Verificar a influência da suplementação com óleos essenciais de *O. gratissimum* e *Z. officinale* sobre os taxas de crescimento e conversão alimentar, parâmetros hematológicos-imunológicos e sobrevivência à infecção por *Streptococcus agalactiae* (Capítulo I);

- Verificar a influência da suplementação com óleos essenciais de *O. gratissimum* e *Z. officinale* sobre parâmetros bioquímicos e imunológicos, como a concentração plasmática de glicose, concentração sérica de colesterol, triglicerídeos e imunoglobulinas, atividade da lisozima sérica e formação de centros de melanomacrófagos no baço de tilápias-do-nilo (Capítulo II);

- Verificar a influência da suplementação com óleos essenciais de *O. gratissimum* e *Z. officinale* sobre a histologia de órgãos internos em tilápias-do-nilo infectadas com *Streptococcus agalactiae* (Capítulo III).

METODOLOGIA GERAL

Obtenção dos peixes

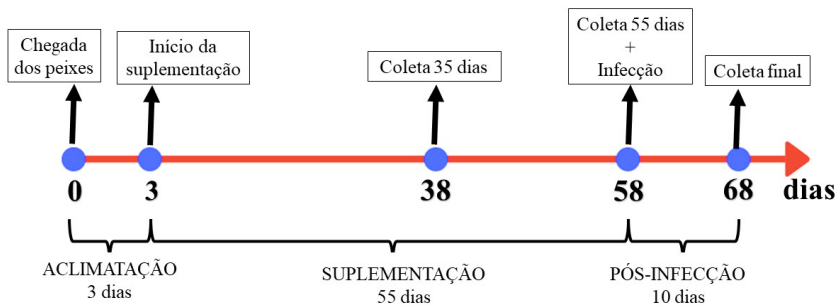
Um total de 1080 juvenis de tilápia-do-nylo pertencentes à linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), com comprimento total médio de $3,92 \pm 0,36$ cm e peso médio de $1,84 \pm 0,52$ g foram obtidos junto à Piscicultura Panamá, situada no município de Paulo Lopes, Santa Catarina, Brasil. Os peixes foram transportados em sacos plásticos até o Laboratório Aquos, vinculado ao Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis-SC). Os peixes foram inicialmente aclimatados em tanques de fibra (200 L) contendo aeração constante e passaram por biometria inicial, bem como análise macroscópica para verificar eventuais sinais clínicos de infecções e parasitismo. Dez peixes foram anestesiados em solução de eugenol (75 mg.L^{-1}) e eutanasiados por comoção cerebral para análise parasitológica. Estes procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC PP008696). Raspados de muco, assim como fragmentos de brânquias, fígado e coração foram colocados entre lâmina e lamínula e analisados a fresco em microscópio óptico para confirmar a ausência de parasitos.

Condições experimentais

Após a biometria, os peixes foram aleatoriamente distribuídos em 24 tanques de fibra (100 L cada) acoplados a sistema de recirculação contendo filtragem mecânica, biológica e ultravioleta, aeração constante e fotoperíodo controlado (12 L : 12 E), totalizando 45 peixes por tanque. Os parâmetros de qualidade da água foram medidos diariamente, pela manhã e à tarde. A temperatura, a concentração de oxigênio dissolvido, o pH, a salinidade, a condutividade elétrica e a concentração de sólidos em suspensão na água foram medidos com equipamento multiparâmetro (Hanna®, modelo HI-9829). As concentrações de amônia total, nitrito, nitrato e alcalinidade foram medidas por teste colorimétrico (Alfakit®, Brasil). Os peixes foram aclimatados ao sistema por três dias, período no qual foram alimentados até saciedade aparente com dieta comercial para peixes onívoros (Nicoluzzi®, Brasil). A composição proximal desta dieta é a seguinte: 40 g.kg^{-1} de proteína bruta, 125 g.kg^{-1} de umidade, 50 g.kg^{-1} de extrato etéreo e 35 g.kg^{-1} de fibra bruta, conforme informações do fabricante.

Após a aclimação, os peixes passaram a receber as dietas experimentais especificadas a seguir, no item “Preparo das dietas”. O período de suplementação foi de 55 dias, e no último dia de suplementação, foi feita infecção experimental com *Streptococcus agalactiae*, após a qual os animais foram mantidos em observações por 10 dias. Foram feitas coletas aos 35 e 55 dias de suplementação e 10 dias após a infecção. A cronologia destes procedimentos é mostrada na Figura 5.

Figura 5 – Desenho esquemático do delineamento experimental utilizado no presente estudo.



Óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados no presente estudo foram obtidos a partir de folhas de manjeriço-cravo e de rizomas de gengibre cultivados na Seção de Plantas Medicinais da EMBRAPA Amazônia Ocidental, situada em Manaus, Amazonas, Brasil (03°06'2304"S 60°01'35,14"O). A altitude média é de 50 m acima do nível do mar e a temperatura média do ar é de 25,6 °C, com pluviosidade anual de 2200 mm. As plantas foram coletadas pela manhã e o material processado no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da EMBRAPA Amazônia Ocidental, Brasil. A extração do óleo foi feita pelo método de hidrodestilação com aparelho de Clevenger modificado. Resumidamente, 500 gramas de folhas frescas de manjeriço-cravo ou de rizomas de gengibre foram colocados em um frasco com volume de 1.200 mL, adicionou-se água até cobrir o material e a manta aquecedora foi ativada. Após duas horas de extração, o óleo essencial foi coletado, acondicionado em frascos de vidro âmbar e estocado a -18 °C.

Para a análise de composição química, utilizou-se cromatógrafo a gás Agilent 7890A (Palo Alto, EUA) equipado com coluna capilar HP-5 de 5%-difênil-95%-dimetil silicone (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm). A temperatura foi programada de 60 a 240 °C, a 3 °C por minuto, utilizando hidrogênio como gás carreador (1,5 mL min⁻¹). Uma solução de 1% de óleo essencial em diclorometano (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) com divisão de fluxo (1:100, injetor a 250 °C) foi injetada. O espectro de massas foi pelo sistema Agilent 5973N operado em modo de impacto de elétrons a 70 eV e acoplado a cromatógrafo Agilent 6890, utilizando os mesmos procedimentos de injeção e temperatura anteriormente descritos. Os índices de retenção foram calculados a partir dos tempos de retenção dos compostos e de uma série de n-alcenos (C7-C26). A identificação dos componentes foi feita por comparação do espectro de massa obtido com os dados de uma biblioteca espectral (MCLAFFERTY; STAUFFER, 1994) e pelos índices de retenção calculados e comparados com valores já publicados (ADAMS, 2007).

Preparo das dietas

O método de inclusão do óleo essencial na ração é baseado nas instruções de Dairiki et al. (2013), utilizando-se álcool de cereais como veículo. Para tal, foi empregada a mesma ração fornecida durante o período de aclimação. Para cada quilograma de ração, uma solução de óleo essencial em 100 mL de álcool de cereais foi aspergida e misturada à dieta. A ração controle foi aspergida somente com álcool de cereais. A secagem da ração foi feita a 25°C durante 24h, em seguida esta foi embalada e armazenada a -18°C. No dia anterior ao fornecimento, a quantidade necessária de ração era pesada e guardada a 4 °C até o momento da alimentação. Foram fornecidas sete diferentes dietas: não suplementada (controle) e suplementada com óleo essencial de *Ocimum gratissimum* a 0,5%, 1% e 1,5% e com óleo essencial de *Zingiber officinale* nas mesmas proporções. As concentrações de óleos essenciais utilizadas nas dietas foram escolhidas com base nos estudos de Sivaram et al. (2004), Nya e Austin (2009), Talpur et al. (2013) e Antache et al. (2014).

Rotina de alimentação

Durante os 55 dias de suplementação, a ração foi fornecida em quantidade recomendada pelo fabricante, proporcional ao peso médio dos peixes, variando de 9,5% (para peixes com menos de 3 g) a 5 % (peixes com mais de 30 g) do peso corporal (Tabela 1). A cada 10 dias,

10 peixes de cada tanque foram medidos para determinar o peso médio, ajustando assim a quantidade de ração de acordo com o crescimento.

Tabela 1 – Alimentação diária de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) de acordo com o peso corporal, a 26-30° C (Fonte: Nicoluzzi Rações, Brasil).

Peso médio dos peixes (g)	Granulometria da ração (mm)	Alimentação diária (% do peso corporal)	Número de tratos por dia
1,5	pó	9,5	6
3,0	pó	9,0	6
6,0	pó	8,0	6
10,0	2,5	6,0	4
15,0	2,5	6,0	4
20,0	2,5	6,0	4
30,0	4,0	5,0	3
45,0	4,0	4,4	3

Desempenho zootécnico

A taxa de crescimento específico (TCE) e o fator de conversão alimentar (FCA) foram calculados de acordo com Fu et al. (1998) a partir das seguintes equações:

$$TTCE = 100 \times [\ln \text{ peso final (g)} - \ln \text{ peso inicial (g)}] / \text{tempo (dias)}$$

$$FFCA = \text{consumo de ração (g)} / [\text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}]$$

Análises hematológicas e preparo do soro

Amostras de sangue foram coletadas aos 35 a 55 dias de suplementação e dez dias após a infecção experimental. Em cada momento, cinco peixes por tanque foram coletados, totalizando 20 peixes por tratamento. Após biometria (comprimento total e peso), os peixes foram anestesiados em solução de eugenol (75 mg.L⁻¹) e o sangue foi coletado por punção do vaso caudal, em seringas de 1 mL contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10% como anticoagulante.

A concentração de glicose plasmática foi determinada de forma individual, imediatamente após a coleta de sangue, com glicosímetro portátil *Accu-Chek*[®] Advantage (Roche Diagnóstica, Brasil). Extensões sanguíneas foram feitas em duplicata e coradas com May-Grünwald-

Giemsa-Wright, de acordo com Ranzani-Paiva et al. (2013), para contagem de trombócitos e leucócitos totais pelo método indireto (ISHIKAWA et al., 2008) e contagem diferencial de leucócitos. Uma alíquota do sangue foi utilizada para determinação do hematócrito pelo método do microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971). Posteriormente, os capilares foram quebrados e a fração plasmática foi utilizada para determinação da proteína plasmática total em refratômetro portátil (modelo 301, Biobrix, São Paulo, Brasil).

Outra alíquota de sangue (5 μ L) foi destinada à contagem total de eritrócitos em câmara de Neubauer, após diluição (1:200) em fluido de Dacie modificado de acordo com Blaxhall e Daisley (1973). A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina e equações hematimétricas foram aplicadas para determinar o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Para obtenção do soro, outros cinco peixes de cada tanque foram coletados, totalizando 20 peixes por tratamento. O sangue foi coletado sem anticoagulante e acondicionado a 4 °C de um dia para outro, para coagulação. O sangue coagulado foi centrifugado a 1400 g por 10 min. O soro foi alíquotado e estocado a - 20 °C para análises posteriores. As amostras de sangue obtidas com anticoagulante (para o hemograma e determinação da atividade fagocitária) foram analisadas individualmente, enquanto as amostras coletadas sem anticoagulante, para obtenção de soro, foram analisadas em *pool* (cinco peixes de cada tanque).

Atividade fagocitária

O percentual de fagocitose no sangue foi determinado pelo método de Cai et al. (2004) modificado por Dotta et al. (2011). Resumidamente, 0,5 mL de sangue foram colocados em microtubos, misturados a 0,25 mL de uma suspensão de 1×10^6 UFC de *S. agalactiae* e agitados. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 28 °C durante 30 min., sendo agitados a cada 10 min. Posteriormente, em vez de centrifugar, conforme recomendação de Cai et al. (2004), o conteúdo dos tubos foi utilizado para confeccionar extensões sanguíneas em duplicata, as quais foram coradas com May-Grünwald-Giemsa-Wright. O número de leucócitos que apresentaram a bactéria em seu interior foi contado e calculado em porcentagem em relação ao número total de leucócitos na extensão.

Análises do soro

Proteína sérica total

A concentração de proteína sérica total foi medida pelo método de biureto descrito por Weichselbaum (1946) pelo kit “Proteínas Totais” (Labtest[®], Minas Gerais, Brasil).

Imunoglobulinas

A concentração de imunoglobulinas no soro foi medida de acordo com Amar et al. (2000), onde 50 µL de soro foram misturados a 50 µL de polietilenoglicol (PEG) 12% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A mistura foi incubada a 25 °C por 2 h, para precipitar somente as imunoglobulinas. O precipitado foi removido por centrifugação (5000 g a 4 °C por 10 min.) e o sobrenadante foi coletado para determinar a concentração de proteína através do método de biureto. A concentração de imunoglobulinas foi obtida subtraindo a concentração de proteína do sobrenadante do valor de proteína sérica total.

Título de aglutinação

O título de aglutinação do soro foi determinado de acordo com Yildirim et al. (2003), com *S. agalactiae*. A bactéria foi cultivada e inativada em formalina 1%. A concentração de células inativadas usadas no teste foi 0,8 em comprimento de onda 550 nm. O ensaio foi conduzido em microplaca de 96 poços com fundo em “U”, onde o soro foi diluído a 1:1 em solução tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4) no primeiro poço (50 µL de PBS: 50 µL de soro) e nos demais poços foi feita diluição seriada fator 2, até o 12^o poço. Em seguida, adicionou-se a cada poço 50 µL de suspensão de bactérias inativadas. A microplaca foi incubada a 25 °C por 18 h em câmara úmida. A aglutinação foi confirmada pela observação de precipitado no fundo do poço. O título de aglutinação foi considerado como o recíproco da última diluição que mostrou aglutinação.

Atividade da lisozima

A atividade da lisozima no soro foi determinada por espectrofotometria segundo Ellis (1990). Uma suspensão de 0,02% (w/v) de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)

em tampão de fosfato 0,05 M (pH 6,2) foi utilizada como substrato. A lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizada como padrão. Para cada ensaio foi preparada uma nova curva padrão. As soluções padrão, bem como as amostras, foram adicionadas ao substrato a 25°C.

Colesterol e triglicerídeos

As concentrações de colesterol e triglicerídeos no soro foram determinadas com os kits comerciais “Colesterol SL” e “Triglicerídeos” (ELITech Group®, Bélgica). Brevemente, após confecção de curva padrão, adicionou-se 3 µL de soro a 300 µL do reagente enzimático apropriado para cada amostra e após 325 s de incubação foi feita a leitura da absorbância a 550 nm.

Análises histológicas

Aos 55 dias de suplementação e dez dias após a infecção, coletou-se órgãos de três peixes de cada tanque (nove por tratamento) para análises histológicas. Imediatamente após a coleta de sangue, os peixes ainda anestesiados foram eutanasiados por comoção cerebral (CEUA/UFSC PP008696) para coleta de fragmentos de fígado, baço, coração e brânquias, bem como o terço anterior do intestino, que foram fixados em formalina tamponada 10%. Os órgãos foram desidratados em série crescente de álcool etílico, clarificados em xilol e incluídos em parafina a 60°C. Cortes de 3 a 5 µm de espessura (micrótomo PAT-MR10) foram corados com hematoxilina de Harris e eosina (HHE). Posteriormente à coloração, as lâminas foram montadas em meio Entellan® e analisadas em microscópio de contraste de interferência de fase (DIC) Axio Imager A.2 (Zeiss, Gottingen, Alemanha).

Em relação à morfologia intestinal, foram medidos o comprimento, largura e o perímetro dos vilos, além de quantificação dos vilos e células calciformes, com o software Zen Pro. Para todos os órgãos, atribuiu-se valores às alterações histológicas, conforme o grau de intensidade: 0 (ausência de alteração), 1 (alteração leve, correspondendo a menos de 25% da área do órgão), 2 (alteração moderada, 25% a 50% da área do órgão) e 3 (alteração severa, mais de 50% da área do órgão), de acordo com o método descrito por Schwaiger et al. (1997) ligeiramente modificado

No tecido branquial foram consideradas as seguintes alterações: aneurisma, congestão e dilatação do veio central, congestão na base da

lamela secundária, descolamento do epitélio da lamela secundária, dilatação do seio venoso, edema justalamelar, fusão de lamelas secundárias, hiperplasia interlamelar, hiperplasia da lamela secundária, infiltrado eosinofílico, infiltrado linfocitário e telangiectasia. No fígado, considerou-se como alterações o aspecto balonoso dos hepatócitos, congestão nos grandes vasos, nos sinusoides e no pâncreas, dilatação dos sinusoides, hipertrofia dos hepatócitos, infiltrado eosinofílico e linfocitário, perda do aspecto cordonal dos sinusoides, perda da estrutura do pâncreas, macroesteatose, microesteatose, necrose e núcleos picnóticos. No coração avaliou-se congestão, infiltrado eosinofílico e linfocitário, microesteatose e necrose. No baço, considerou-se congestão, infiltrado eosinofílico e linfocitário e necrose, e no intestino, infiltrado eosinofílico e linfocitário e necrose.

Os cortes histológicos do baço foram também utilizados para contagem e determinação da área de centros de melanomacrófagos. Estes dados foram obtidos por técnica de contagem de pontos utilizando graticula de Weibel (WEIBEL, 1963) acoplada a microscópio óptico, com metodologia adaptada de Garcia e Magalhães (2008).

Desafio com *Streptococcus agalactiae*

Após 55 dias de suplementação, todos os peixes foram desafiados com *S. agalactiae*. A cepa utilizada no desafio (AQP/049) foi isolada de tilápias acometidas por estreptococose em um surto de mortalidade no estado do Ceará, Brasil. O isolado foi obtido de um laboratório de diagnóstico sanitário em peixes (Laboratório Acquapiscis, São Paulo, Brasil). Para identificação molecular, as bactérias foram mantidas em tubos contendo meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*) (HiMedia, Mumbai, Índia), reativadas em placas de Petri contendo meio sólido BHI (HiMedia) e incubadas a 28 °C por 12 h. A cepa foi identificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) e o DNA foi purificado através do kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As sequências de nucleotídeos em formato FASTA foram submetidas à base de dados NCBI/BLAST.

A infecção experimental foi feita via gavagem (10^8 UFC . g de peso corporal⁻¹), com a massa bacteriana suspensa em solução fisiológica. Após a infecção, os peixes foram observados a cada 3 h durante 10 dias para registrar a mortalidade e os sinais clínicos da infecção. A porcentagem de sobrevivência relativa (PRS) foi calculada de acordo com Amend (1981). Os peixes que morreram foram

imediatamente removidos do tanque. Dez dias após o desafio e imediatamente após a coleta de sangue, os peixes ainda anestesiados foram eutanasiados por comoção cerebral (CEUA/UFSC PP008696). Após a eutanásia, fragmentos de fígado, rim e cérebro foram coletados assepticamente para reisolamento da bactéria. As amostras foram colocadas em tubos contendo meio líquido BHI (HiMedia, Mumbai, Índia) para crescimento. Posteriormente, o conteúdo foi plaqueado em meio ágar triptona de soja (HiMedia) enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e as placas foram incubadas a 28 °C por 12 h para visualização e caracterização das colônias de *S. agalactiae*.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise pelo software *Statistica 13.0* (Statsoft Inc., Tulsa, EUA). Aplicou-se análise de variância (ANOVA) seguida teste de Tukey para comparação de médias. Nos casos em que os pré-requisitos da ANOVA não foram atendidos (dados de intensidade das lesões histológicas e número de centros de melanomacrófagos), utilizou-se teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para comparação de médias. Os dados de glicose plasmática, proteína sérica total, imunoglobulinas, colesterol, triglicerídeos e atividade da lisozima no soro foram também comparados entre os tempos de coleta (35 e 55 dias) pelo teste t de Student. Para todos os testes estatísticos, fixou-se nível de significância de 5%. Transformações de dados foram aplicadas quando necessário.

FORMATAÇÃO DOS CAPÍTULOS DA TESE

Esta Tese está dividida em três capítulos redigidos em forma de artigo científico, sendo o Capítulo I referente a artigo publicado no periódico “Aquaculture”, o Capítulo II destinado a submissão ao periódico “Fish and Shellfish Immunology” e o Capítulo III destinado a submissão ao periódico “Aquaculture”. Os capítulos estão formatados de acordo com as normas de seus respectivos periódicos.

CAPÍTULO I

Efeito de óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre em tilápias-do-nilo desafiadas com *Streptococcus agalactiae*

“Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*”

Aline Brum ^a, Scheila Anelise Pereira ^a, Marco Shizuo Owatari ^a, Edsandra Campos Chagas ^b, Francisco Célio Maia Chaves ^b, José Luiz Pedreira Mouriño ^a, Maurício Laterça Martins ^a

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

^b EMBRAPA Amazônia Ocidental, Rod. AM 010, km 29, Zona Rural, 69010-970 Manaus, AM, Brasil.

* Autor correspondente: A. Brum. Laboratório AQUOS- Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

Artigo publicado no periódico Aquaculture, v. 468, p. 235-243, 2017.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.020>

Resumo

A tilápia-do-nilo vem despontando como o peixe de água doce mais cultivado no mundo, porém, surtos de enfermidades causam grandes perdas na produção. Compostos ativos de origem vegetal podem promover a resistência a patógenos e incrementar o desempenho zootécnico, constituindo alternativa aos produtos sintéticos. O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da suplementação com óleos essenciais de manjeriço-cravo (*Ocimum gratissimum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) na dieta de tilápias-do-nilo, com relação ao ganho de peso, parâmetros hemato-imunológicos e sobrevivência após desafio com *Streptococcus agalactiae*. Juvenis alimentados por 55 dias com dietas suplementadas (0,5%, 1,0% e 1,5%) foram desafiados via gavagem com *S. agalactiae* e monitorados durante 10 dias. Aos 35 e 55 dias de suplementação e 10 dias após a infecção, foram coletadas amostras de sangue para análises hemato-imunológicas. O óleo de manjeriço-cravo a 0,5% proporcionou melhoria significativa na conversão alimentar ($1,34 \pm 0,13$ no controle, com peso final de $19,25 \pm 2,38$). Aos 55 dias, o número de neutrófilos foi mais alto nos peixes cuja dieta foi suplementada com gengibre a 1,0%, em comparação com gengibre a 0,5% e 1,5%. Dez dias após a infecção, houve diferença significativa no número de trombócitos, leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos. Com exceção do gengibre a 1,5%, todas as dietas suplementadas proporcionaram aumento na atividade fagocitária. Após o desafio, o único tratamento com 100% de sobrevivência relativa foi o gengibre 0,5%, enquanto o controle apresentou 2,86% de mortalidade. A suplementação dietária com óleos essenciais mostrou-se útil para auxiliar no ganho de peso, resposta imunológica e resistência a enfermidades.

Palavras-chave: Conversão alimentar, hematologia, *Ocimum gratissimum*, fagocitose, suplementação dietária, *Zingiber officinale*

Abstract

Nile tilapia is the most farmed freshwater fish; however, disease outbreaks are the main cause of losses in the production. Active compounds from plants are an alternative to synthetic chemicals to enhance growth and disease resistance. This study aimed to verify the effects of dietary supplementation with essential oils of clove basil (*Ocimum gratissimum*) and ginger (*Zingiber officinale*) on tilapia, regarding growth, hemato-immunological parameters and survival to challenge with *S. agalactiae*. Juveniles fed for 55 days with supplemented diets (0.5%, 1.0% and 1.5%) were challenged by gavage with *S. agalactiae* and monitored for 10 days. At 35 and 55 days of supplementation and 10 days after infection, blood was collected for hemato-immunological assays. Clove basil at 0.5% significantly improved feed conversion ratio (1.34 ± 0.13 in control, with final weight of 19.25 ± 2.38). At 55 days, neutrophils were higher in fish fed ginger 1.0% compared to ginger 0.5% and 1.5%. Ten days after infection, there were significant differences in thrombocytes, total leukocytes, lymphocytes and neutrophils. Except for 1.5% ginger, all supplemented diets showed increased phagocytic activity. After challenge, the only group with 100% relative survival was 0.5% ginger, while control had 2.86% mortality. Dietary supplementation with essential oils was useful for improving growth, immune responses and disease resistance.

Keywords: Feed efficiency, hematology, *Ocimum gratissimum*, phagocytosis, dietary supplementation, *Zingiber officinale*

Destaques

- Óleos essenciais de manjeriçã-cravo e gengibre foram avaliados como suplementos na dieta de tilápias-do-nylo durante 55 dias;
- Ambos os óleos modularam a resposta imunológica e proporcionaram resistência à infecção experimental com *Streptococcus agalactiae*;
- O óleo essencial de manjeriçã-cravo mostrou propriedades promotoras de crescimento.

1. Introdução

A tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus* L.) é um dos peixes de água doce mais produzidos e comercializados no mundo, sendo cultivada em mais de 135 países (FAO, 2014). Entretanto, infecções bacterianas têm causado mortalidades massivas na tilapicultura. As infecções causadas por bactérias do gênero *Streptococcus*, representadas principalmente por *Streptococcus agalactiae* e *S. iniae*, são a principal causa de perdas em cultivos de tilápia. Setenta por cento de todos os isolados provenientes de tilápias cultivadas foram identificados como *Streptococcus*, com 82% destes correspondendo a *S. agalactiae* (MSD Animal Health, 2012). *S. agalactiae* é conhecida por causar infecções em humanos e bovinos, tendo emergido recentemente como um patógeno de peixes que apresenta potencial zoonótico (Evans et al., 2009). Esta bactéria causa enfermidade em diversas espécies de peixes, porém, a tilápia-do-nylo é particularmente mais susceptível (Li et al., 2014). Os sinais clínicos da infecção incluem septicemia, exoftalmia, opacidade nas córneas, melanose, natação errática, ascite e hemorragias nos órgãos internos (Chen et al., 2012).

Vacinas comerciais efetivas contra *S. agalactiae* já estão disponíveis comercialmente, porém, há entaves para a vacinação nos estágios iniciais de vida. Além disso, a tilápia é susceptível a muitas outras enfermidades, como as causadas por *Francisella*, *Flavobacterium*, *Trichodina*, *Dactylogyrus*, *Edwardsiella*, *Nocardia*, *Iridovirus*, *Saprolegnia* e *Branchiomyces* (Absali e Mohamad, 2010; MSD Animal Health, 2012). Considerando estas questões, muitos estudos têm investigado o uso profilático de produtos naturais para proporcionar resistência a enfermidades.

Recentemente, há crescente tendência ao uso de extratos vegetais para incrementar a resposta imune e resistência a enfermidades em peixes (Bulfony et al., 2015). Entre as principais vantagens do uso destes

produtos estão a redução da toxicidade, da contaminação aquática, da quantidade de resíduos tóxicos na carne de peixes destinados a consumo humano e do risco de seleção de patógenos resistentes, além de menor custo em comparação com os produtos sintéticos (Coimbra et al., 2006).

As plantas sintetizam diversos compostos ativos capazes de aumentar a capacidade imunológica em animais (Kotzekidou et al., 2007). Muitos extratos vegetais têm se mostrado eficazes como imunomoduladores em peixes, proporcionando maior resistência a enfermidades. Estes extratos podem ser utilizados nos períodos mais críticos do ciclo produtivo (Bricknell e Dalmo, 2005).

Plantas do gênero *Ocimum* (Lamiaceae), popularmente conhecidas como “manjericões”, pertencem a um grupo economicamente importante de herbáceas que ocorrem em áreas tropicais da África, América e Ásia (Orafidiya et al., 2004). Uma das espécies mais relevantes é *Ocimum gratissimum* L., popularmente conhecida como “manjericão-cravo”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo” ou simplesmente “manjericão”. Diversos estudos têm demonstrado suas propriedades antimicrobianas, inclusive contra patógenos que acometem peixes (Haniffa e Kavitha, 2012). A suplementação dietária com folhas secas em pó durante 56 dias proporcionou melhoria na composição da carcaça de bagres africanos (*Clarias gariepinus*), aumentando a umidade e o conteúdo lipídico (Anyanwu et al., 2012). Comprovou-se que o óleo essencial é um anestésico seguro para jundiás (*Rhamdia quelen*), tambaquis (*Colossoma macropomum*) e matrinxãs (*Brycon amazonicus*) (Boijink et al., 2016; Ribeiro et al., 2016; Silva et al., 2012). Outras plantas do gênero *Ocimum* incrementaram o crescimento, resposta imunológica e resistência a doenças em peixes (Harikrishnan et al., 2010; Punitha et al., 2008; Sutili et al., 2016). Porém, até o presente momento, não há estudos que mostrem os efeitos da suplementação dietária com óleo essencial de manjericão-cravo em peixes.

O gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) (Zingiberaceae) é uma planta medicinal cujo rizoma é conhecido por apresentar propriedades imunoestimulantes (Ali et al., 2008). Estudos recentes têm mostrado os efeitos benéficos da suplementação dietária com gengibre sobre o crescimento, resposta imune e resistência a enfermidades em peixes (Dugenci et al., 2003; Kanani et al., 2014; Nya e Austin, 2009; Talpur et al., 2013). Porém, os estudos prévios utilizaram apenas gengibre seco e pulverizado, não havendo estudos que mostrem os efeitos do óleo essencial.

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da suplementação dietária com óleos essenciais de manjericão-cravo e gengibre sobre o

crescimento, parâmetros hemato-imunológicos e resistência à infecção por *S. agalactiae* em tilápias-do-nilo.

2. Material e Métodos

2.1. Peixes e condições experimentais

Um total de 1080 juvenis de tilápia-do-nilo pertencentes à linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), com comprimento total de $3,92 \pm 0,36$ cm e peso de $1,84 \pm 0,52$ g, foi obtido junto a uma piscicultura comercial no município de Paulo Lopes, Santa Catarina, Brasil. Os peixes passaram por exame macroscópico para verificar a presença de eventuais injúrias causadas por parasitos ou outros patógenos. Dez peixes foram anestesiados com eugenol (75 mg.L^{-1}) e eutanasiados por comoção cerebral (CEUA/UFSC PP008696) para análise parasitológica do muco, brânquias e órgãos internos, bem como para verificação de qualquer sinal clínico de enfermidade. Após a biometria, os peixes foram aleatoriamente distribuídos em 24 tanques circulares de fibra (100 L cada), totalizando 45 peixes por tanque. Os tanques eram conectados a um sistema de recirculação contendo filtragem mecânica, biológica e ultravioleta. Havia aeração constante, aquecedor central com termostato regulado a $26 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo controlado (12 h). Os tratamentos foram iniciados após três dias de aclimação.

Durante o período de aclimação, os peixes foram alimentados até saciedade aparente com ração comercial contendo 40% de proteína bruta (Nicoluzzi[®], Brasil). Após a aclimação, os peixes foram alimentados por 55 dias com as dietas experimentais a seguir: controle (quatro réplicas), óleo essencial de manjeriço-cravo a 0,5% (três réplicas), 1,0% (três réplicas) e 1,5% (três réplicas) e óleo essencial de gengibre a 0,5% (três réplicas), 1,0% (três réplicas) e 1,5% (quatro réplicas), totalizando sete tratamentos em 24 unidades experimentais. A escolha das concentrações baseou-se nos resultados de Antache et al. (2014), Nya e Austin (2009) e Talpur et al. (2013), que utilizaram gengibre seco em pó e Sivaram et al. (2004), que acrescentaram extrato metanólico de manjeriço-santo (*Ocimum sanctum*) em dietas para peixes.

Os parâmetros de qualidade de água foram verificados diariamente, pela manhã e ao final da tarde. Temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, pH, salinidade, condutividade elétrica e total de sólidos em suspensão foram medidos com equipamento multiparâmetro HI-9829 (Hanna Instruments, Padova, Italy). As concentrações de

amônia total, nitrito, nitrato e alcalinidade foram medidas com kits colorimétricos (Alfakit, Florianópolis, Brasil).

2.2.Extração dos óleos essenciais e determinação de sua composição

Os óleos essenciais utilizados no presente estudo foram obtidos a partir de folhas de manjeriço-cravo e de rizomas de gengibre cultivados na Seção de Plantas Medicinais da EMBRAPA Amazônia Ocidental, situada em Manaus, Amazonas, Brasil (03°06'2304"S 60°01'35,14"O). A altitude média é de 50 m acima do nível do mar e a temperatura média do ar é de 25,6 °C, com pluviosidade anual de 2200 mm. As plantas foram coletadas pela manhã e o material processado no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da EMBRAPA Amazônia Ocidental, Brasil. A extração do óleo foi feita pelo método de hidrodestilação com aparelho de Clevenger modificado. Resumidamente, 500 gramas de folhas frescas de manjeriço-cravo ou de rizomas de gengibre foram colocados em um frasco com volume de 1.200 mL, adicionou-se água até cobrir o material e a manta aquecedora foi ativada. Após duas horas de extração, o óleo essencial foi coletado, acondicionado em frascos de vidro âmbar e estocado a -18 °C.

Para a análise de composição química, utilizou-se cromatógrafo a gás Agilent 7890A (Palo Alto, EUA) equipado com coluna capilar HP-5 de 5%-difênil-95%-dimetil silicone (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm). A temperatura foi programada de 60 a 240 °C, a 3 °C por minuto, utilizando hidrogênio como gás carreador (1,5 mL . min⁻¹). Uma solução de 1% de óleo essencial em diclorometano (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) com divisão de fluxo (1:100, injetor a 250 °C) foi injetada. O espectro de massas foi pelo sistema Agilent 5973N operado em modo de impacto de elétrons a 70 eV e acoplado a cromatógrafo Agilent 6890, utilizando os mesmos procedimentos de injeção e temperatura anteriormente descritos. Os índices de retenção foram calculados a partir dos tempos de retenção dos compostos e de uma série de n-alcenos (C7-C26). A identificação dos componentes foi feita por comparação do espectro de massa obtido com os dados de uma biblioteca espectral (McLafferty e Stauffer, 1994) e pelos índices de retenção calculados e comparados com valores já publicados (Adams, 2007).

2.3.Preparo das dietas suplementadas

O preparo das dietas suplementadas foi feito de acordo com a metodologia proposta por Dairiki et al. (2013) utilizando álcool de

cereais como veículo para diluição dos óleos essenciais. A incorporação foi feita na mesma ração comercial fornecida durante o período de aclimatação, cuja composição proximal é a seguinte: 40 g.kg⁻¹ de proteína bruta, 125 g.kg⁻¹ de umidade, 50 g.kg⁻¹ de extrato etéreo e 35 g.kg⁻¹ de fibra bruta. Para cada quilograma de ração, uma solução de óleo essencial em 100 mL de álcool de cereais foi aspergida e misturada na dieta. Na dieta controle, aspergiu-se somente álcool de cereais, na mesma proporção. As dietas permaneceram secando a 25 °C por 24 h, sendo posteriormente acondicionadas em sacos plásticos e estocadas a -18 °C. Um dia antes da alimentação, a quantidade necessária de ração era pesada e guardada a 4 °C até o momento do fornecimento.

2.4. Rotina de alimentação

Durante os 55 dias de suplementação, a ração foi fornecida em quantidade recomendada pelo fabricante, proporcional ao peso médio dos peixes, variando de 9,5% (para peixes com menos de 3 g) a 5 % (peixes com mais de 30 g) do peso corporal. A cada 10 dias, 10 peixes de cada tanque foram medidos para determinar o peso médio, ajustando assim a quantidade de ração de acordo com o crescimento.

2.5. Parâmetros de crescimento

A taxa de crescimento específico (TCE) e o fator de conversão alimentar (FCA) foram calculados de acordo com Fu et al. (1998) a partir das seguintes equações:

$$\text{TCE} = 100 \times (\ln \text{ peso final [g]} - \ln \text{ peso inicial [g]}) / \text{tempo (dias)}$$

2.6. Coleta de soro e análises hematológicas

Amostras de sangue foram coletadas aos 35 a 55 dias de suplementação e dez dias após a infecção experimental. Em cada momento, cinco peixes por tanque foram coletados, totalizando 20 peixes por tratamento. Após biometria (comprimento total e peso), os peixes foram anestesiados em solução de eugenol (75 mg.L⁻¹) e o sangue foi coletado por punção do vaso caudal, em seringas de 1 mL contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10% como anticoagulante.

Extensões sanguíneas foram feitas em duplicata e coradas com May-Grünwald-Giemsa-Wright, de acordo com Ranzani-Paiva et al.

(2013), para contagem de trombócitos e leucócitos totais pelo método indireto (Ishikawa et al., 2008) e contagem diferencial de leucócitos. Uma alíquota do sangue foi utilizada para determinação do hematócrito pelo método do microhematócrito (Goldenfarb et al., 1971). Posteriormente, os capilares foram quebrados e a fração plasmática foi utilizada para determinação da proteína plasmática total em refratômetro portátil (modelo 301, Biobrix, São Paulo, Brasil).

Outra alíquota de sangue (5 μ L) foi destinada à contagem total de eritrócitos em câmara de Neubauer, após diluição (1:200) em fluido de Dacie modificado de acordo com Blaxhall e Daisley (1973). A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina e equações hematimétricas foram aplicadas para determinar o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Ranzani-Paiva et al., 2013).

Para obtenção do soro, outros cinco peixes de cada tanque foram coletados, totalizando 20 peixes por tratamento. O sangue foi coletado sem anticoagulante e acondicionado a 4 °C de um dia para outro, para coagulação. O sangue coagulado foi centrifugado a 1400 g por 10 min. O soro foi alíquotado e estocado a - 20 °C para análises posteriores.

As amostras de sangue obtidas com anticoagulante (para o hemograma e determinação da atividade fagocitária) foram analisadas individualmente, enquanto as amostras coletadas sem anticoagulante, para obtenção de soro, foram analisadas em *pool* (cinco peixes de cada tanque).

2.7. Atividade fagocitária

O percentual de fagocitose foi determinado pelo método de Cai et al. (2004) modificado por Dotta et al. (2011). Resumidamente, 0,5 mL de sangue foram colocados em microtubos de centrífuga, misturados a 0,25 mL de uma suspensão de 1×10^6 UFC de *S. agalactiae* e agitados. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 28 °C durante 30 min., sendo agitados a cada 10 min. Posteriormente, em vez de centrifugar, conforme recomendação de Cai et al. (2004), o conteúdo dos tubos foi utilizado para confeccionar extensões sanguíneas em duplicata, as quais foram coradas com May-Grünwald-Giemsa-Wright. O número de leucócitos que apresentaram a bactéria em seu interior foi contado e calculado em porcentagem em relação ao número total de leucócitos na extensão.

2.8. Proteína sérica total e imunoglobulinas

A concentração de proteína sérica total foi medida pelo método de biureto descrito por Weichselbaum (1946) pelo kit “Proteínas Totais” (Labtest[®], Minas Gerais, Brasil). A concentração de imunoglobulinas no soro foi medida de acordo com Amar et al. (2000), onde 50 µL de soro foram misturados a 50 µL de polietilenoglicol (PEG) 12% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A mistura foi incubada a 25 °C por 2 h, para precipitar somente as imunoglobulinas. O precipitado foi removido por centrifugação (5000 g a 4 °C por 10 min.) e o sobrenadante foi coletado para determinar a concentração de proteína através do método de biureto. A concentração de imunoglobulinas foi obtida subtraindo a concentração de proteína do sobrenadante do valor de proteína sérica total.

2.9. Título de aglutinação do soro

O título de aglutinação do soro foi determinado de acordo com Yildirim et al. (2003), com *S. agalactiae*. A bactéria foi cultivada e inativada em formalina 1%. A concentração de células inativadas usadas no teste foi 0,8 em comprimento de onda 550 nm. O ensaio foi conduzido em microplaca de 96 poços com fundo em “U”, onde o soro foi diluído a 1:1 em solução tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4) no primeiro poço (50 µL de PBS: 50 µL de soro) e nos demais poços foi feita diluição seriada fator 2, até o 12^o poço. Em seguida, adicionou-se a cada poço 50 µL de suspensão de bactérias inativadas. A microplaca foi incubada a 25 °C por 18 h em câmara úmida. A aglutinação foi confirmada pela observação de precipitado no fundo do poço. O título de aglutinação foi considerado como o recíproco da última diluição que mostrou aglutinação.

2.10. Desafio com *Streptococcus agalactiae*

Após 55 dias de suplementação, todos os peixes foram desafiados com *S. agalactiae*. A cepa utilizada no desafio (AQP/049) foi isolada de tilápias acometidas por estreptococose em um surto de mortalidade no estado do Ceará, Brasil. O isolado foi obtido de um laboratório de diagnóstico sanitário em peixes (Laboratório Acquapiscis, São Paulo, Brasil). Para identificação molecular, as bactérias foram mantidas em tubos contendo meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*) (HiMedia, Mumbai, Índia), reativadas em placas de Petri contendo meio sólido

BHI (HiMedia) e incubadas a 28 °C por 12 h. A cepa foi identificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) e o DNA foi purificado através do kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As sequências de nucleotídeos em formato FASTA foram submetidas à base de dados NCBI/BLAST.

A infecção experimental foi feita via gavagem (10^8 UFC . g de peso corporal⁻¹), com a massa bacteriana suspensa em solução fisiológica. Após a infecção, os peixes foram observados a cada 3 h durante 10 dias para registrar a mortalidade e os sinais clínicos da infecção. A porcentagem de sobrevivência relativa (PRS) foi calculada de acordo com Amend (1981). Os peixes que morreram foram imediatamente removidos do tanque. Dez dias após o desafio e imediatamente após a coleta de sangue, os peixes ainda anestesiados foram eutanasiados por comoção cerebral (CEUA/UFSC PP008696). Após a eutanásia, fragmentos de fígado, rim e cérebro foram coletados assepticamente para reisolamento da bactéria. As amostras foram colocadas em tubos contendo meio líquido BHI (HiMedia, Mumbai, Índia) para crescimento. Posteriormente, o conteúdo foi plaqueado em meio ágar triptona de soja (HiMedia) enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e as placas foram incubadas a 28 °C por 12 h para visualização e caracterização das colônias de *S. agalactiae*.

2.11. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com o software *Statistica 13.0* (Statsoft Inc., Tulsa, EUA). Aplicou-se teste de Tukey para comparação de médias, com nível de significância de 5%. Transformações de dados foram aplicadas quando necessárias.

3. Resultados

3.1. Composição dos óleos essenciais

O óleo essencial de manjeriço-cravo (Fig. 1A) mostrou 1,8-cineol como componente principal (40,4%), seguido por eugenol (22,4%) e β -selineno (12,9%). O óleo essencial de gengibre (Fig. 1B) era composto principalmente por geranial ou citral A (23,9%) e neral ou citral B (17,2%), dois compostos isoméricos que totalizaram 41,1% de citral.

3.2. *Qualidade da água*

Ao longo do experimento, a temperatura média foi de $26,70 \pm 1,17$ °C, oxigênio dissolvido $6,36 \pm 0,47$ mg.L⁻¹, pH $7,53 \pm 0,31$, condutividade elétrica $592,70 \pm 184,97$ µS.cm⁻¹, salinidade $0,28 \pm 0,10$, amônia total $0,85 \pm 0,65$ mg.L⁻¹, nitrito $0,14 \pm 0,14$ mg.L⁻¹, nitrato $0,00 \pm 0,00$ mg.L⁻¹, alcalinidade $54,08 \pm 30,69$ mg CaCO₃.L⁻¹ e total de sólidos em suspensão $285,93 \pm 92,27$ mg.L⁻¹.

3.3. *Parâmetros de crescimento*

Em todos os tratamentos, desde o primeiro dia de alimentação, os peixes consumiram prontamente as dietas. Em relação aos parâmetros de crescimento (Tabela 1), após 55 dias de alimentação, o comprimento médio dos peixes foi significativamente menor entre os alimentados com gengibre a 1,5% e manjeriço a 1,5%, os únicos que diferiram significativamente do controle. Observando o peso médio dos peixes, os animais tratados com manjeriço a 0,5% mostraram valores significativamente mais altos do que os demais.

As médias mais baixas ocorreram nos tratamentos 1,5%, para ambos os óleos, que mostraram resultado similar. Os demais tratamentos não diferiram significativamente do controle.

Na taxa de crescimento específico (TCE), o tratamento manjeriço 0,5% foi similar ao controle e mais alto do que os demais, enquanto o tratamento gengibre 1,5% apresentou os valores mais baixos. O fator de conversão alimentar (FCA) foi significativamente melhor no tratamento manjeriço 0,5% do que em todos os outros, enquanto o tratamento gengibre 1,5% apresentou os valores mais altos.

Tabela 1 – Parâmetros de crescimento (média \pm desvio padrão) de tilápias-donilo após 55 dias de suplementação com óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale*) e manjeriço-cravo (*Ocimum gratissimum*). TCE = taxa de crescimento específico, FCA= fator de conversão alimentar. Letras distintas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Tratamentos	Comprimento (cm) *	Peso (g) *	TCE (%) *	FCA *
Controle	10,18 \pm 0,81 ^a	19,25 \pm 2,38 ^b	4,36 \pm 0,17 ^{ab}	1,34 \pm 0,13 ^{bc}
Gengibre 0,5%	10,09 \pm 0,58 ^a	18,05 \pm 1,72 ^{bc}	4,27 \pm 0,18 ^{ab}	1,39 \pm 0,08 ^{bc}
Gengibre 1,0%	9,71 \pm 0,58 ^{ab}	15,88 \pm 2,71 ^{bcd}	4,05 \pm 0,22 ^{bc}	1,47 \pm 0,21 ^{bc}
Gengibre 1,5%	9,06 \pm 1,18 ^b	12,54 \pm 2,87 ^d	3,83 \pm 0,20 ^c	1,85 \pm 0,11 ^a
Manjeriço 0,5%	9,63 \pm 0,56 ^{ab}	22,88 \pm 1,51 ^a	4,61 \pm 0,11 ^a	1,21 \pm 0,09 ^c
Manjeriço 1,0%	9,68 \pm 0,69 ^{ab}	15,76 \pm 3,31 ^{bcd}	4,06 \pm 0,11 ^{bc}	1,48 \pm 0,13 ^{bc}
Manjeriço 1,5%	9,25 \pm 1,19 ^b	3,97 \pm 0,14 ^{bc}	4,06 \pm 0,11 ^{bc}	1,62 \pm 0,14 ^{ab}

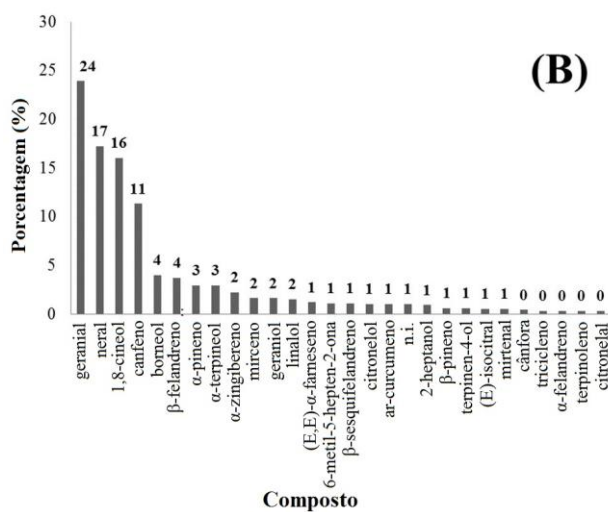
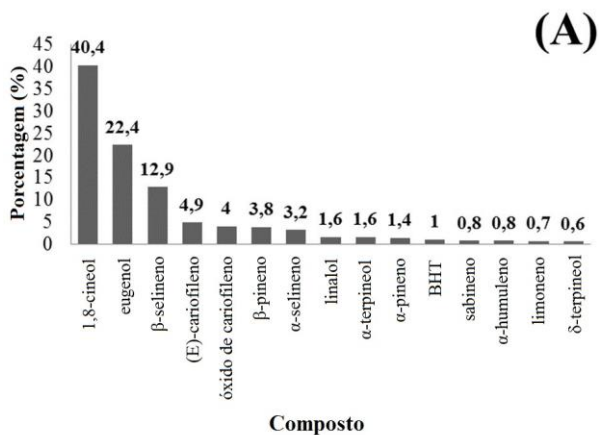


Fig. 1. Composição dos óleos essenciais. A. Manjeriçao-cravo (*Ocimum gratissimum*) B. Gengibre (*Zingiber officinale*). n.i. = compostos não identificados.

3.4. Parâmetros hematológicos

Aos 35 dias de suplementação, observou-se diferença no hematócrito e na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Com relação ao hematócrito, nenhum dos tratamentos diferiu

do controle, mas os animais alimentados com ração contendo gengibre a 0,5% mostraram valores significativamente mais altos do que os que receberam manjeriço a 1,0% (Tabela 2).

Quanto ao CHCM, os resultados são contrários aos do hematócrito, com os animais tratados com gengibre 0,5% mostrando valores mais baixos do que o manjeriço 1,0%, e nenhum dos tratamentos diferiu do controle. Aumento no número de neutrófilos foi observado nos peixes alimentados com manjeriço a 1,0%, em comparação com manjeriço a 0,5% e gengibre a 1,0%. Os demais parâmetros hematológicos não mostraram diferença significativa aos 35 dias de suplementação.

Após 55 dias de alimentação (Tabela 3), a contagem de eritrócitos foi mais baixa nos peixes alimentados com gengibre a 1,5%, enquanto os demais animais que recebem dieta suplementada não diferiram do controle. Com relação aos resultados do hematócrito, gengibre a 0,5% foi o único tratamento similar ao controle, enquanto os demais foram significativamente mais baixos. Novamente, o hematócrito dos peixes alimentados com gengibre a 1,5% foi mais baixo do que em todos os outros tratamentos.

A concentração de hemoglobina nos peixes alimentados com gengibre a 0,5% e manjeriço 1,0% não diferiu do controle, e nos demais tratamentos mostrou valores mais baixos. Da mesma maneira que no hematócrito e na contagem de eritrócitos, os peixes tratados com gengibre a 1,5% mostraram níveis mais baixos de hemoglobina do que todos os outros. Na contagem diferencial de leucócitos, a única diferença significativa foi no número de neutrófilos, que foi mais alto nos animais alimentados com gengibre a 1,0% do que com gengibre a 1,5%, porém, nenhum dos tratamentos diferiu do controle. Os demais parâmetros não mostraram diferença significativa após 55 dias de suplementação.

Tabela 2- Parâmetros hematológicos (média ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo após 35 dias de suplementação com óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale*) e manjeriço-cravo (*Ocimum gratissimum*). VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT= proteína plasmática total. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos.

Parâmetros	Controle			<i>Zingiber officinale</i>			<i>Ocimum gratissimum</i>		
	0%	0,5%	1,0%	0,5%	1,0%	1,5%	0,5%	1,0%	1,5%
Eritrócitos ($\times 10^6, \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	2,03 ± 0,33	1,86 ± 0,41	1,80 ± 0,52	1,84 ± 0,45	1,63 ± 0,45	1,84 ± 0,49	1,76 ± 0,55	1,99 ± 0,45	
Hematócrito (%) *	28,67 ± 5,84 ^{ab}	32,89 ± 5,31 ^a	29,41 ± 7,77 ^{ab}	27,13 ± 5,39 ^{ab}	27,13 ± 5,39 ^{ab}	28,80 ± 8,56 ^{ab}	25,44 ± 6,65 ^b	26,21 ± 6,54 ^{ab}	
Hemoglobina (g.dL ⁻¹) ^{NS}	8,07 ± 0,80	8,07 ± 0,97	7,64 ± 1,41	7,67 ± 0,83	7,84 ± 1,17	7,84 ± 1,17	7,72 ± 1,10	8,12 ± 1,03	
VCM (fL) ^{NS}	144,03 ± 5,73	183,58 ± 2,37	170,68 ± 0,90	177,56 ± 9,69	164,04 ± 52,36	158,52 ± 80,61	137,05 ± 46,71		
CHCM (g.dL ⁻¹) *	29,30 ± 6,91 ^{ab}	24,96 ± 3,97 ^b	27,36 ± 7,47 ^{ab}	29,53 ± 7,72 ^{ab}	28,79 ± 6,99 ^{ab}	31,84 ± 5,94 ^{ab}	32,46 ± 7,14 ^a		
PPT (g.dL ⁻¹) ^{NS}	6,65 ± 0,51	6,45 ± 0,50	6,65 ± 0,57	6,57 ± 0,44	6,90 ± 1,09	6,63 ± 0,54	7,09 ± 0,85		
Leucócitos totais ($\times 10^3, \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	41,12 ± 11,98	39,60 ± 19,82	39,29 ± 14,59	47,04 ± 14,92	52,89 ± 17,24	48,41 ± 24,85	48,31 ± 22,05		
Trombócitos ($\times 10^3, \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	29,60 ± 14,75	24,09 ± 9,22	23,62 ± 13,54	30,86 ± 18,17	36,12 ± 21,48	36,06 ± 16,47	26,24 ± 8,73		
Linfócitos ($\times 10^3, \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	37,12 ± 10,48	36,40 ± 18,31	37,29 ± 14,10	44,33 ± 14,58	51,06 ± 16,45	43,52 ± 24,46	44,46 ± 20,67		
Neutrófilos ($\times 10^3, \mu\text{L}^{-1}$) *	2,50 ± 1,63 ^{ab}	1,87 ± 1,53 ^{ab}	1,24 ± 0,84 ^b	2,25 ± 3,31 ^{ab}	1,25 ± 1,56 ^b	4,19 ± 2,18 ^a	2,96 ± 2,29 ^{ab}		
Monócitos ($\times 10^3, \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	1,13 ± 0,97	1,27 ± 1,34	0,71 ± 0,45	0,37 ± 0,38	0,58 ± 0,54	0,69 ± 0,93	0,87 ± 1,06		

Tabela 3- Parâmetros hematológicos (média ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo após 55 dias de suplementação com óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale*) e manjerição-cravo (*Ocimum gratissimum*). VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT= proteína plasmática total. Letras distintas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Parâmetros	Zingiber officinale				Ocimum gratissimum			
	Controle 0%	0,5%	1,0%	1,5%	0,5%	1,0%	1,5%	1,5%
Eritrócitos ($\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) *	2,14 ± 0,48 ^a	1,91 ± 0,43 ^{ab}	1,64 ± 0,79 ^{ab}	1,37 ± 0,58 ^b	1,58 ± 0,70 ^{ab}	1,88 ± 0,57 ^{ab}	1,80 ± 0,31 ^{ab}	
Hematócrito (%) *	29,25 ± 5,98 ^a	24,47 ± 5,05 ^{abc}	23,27 ± 5,81 ^{bc}	18,90 ± 6,01 ^c	19,87 ± 4,45 ^{bc}	25,67 ± 4,78 ^{bc}	21,93 ± 6,47 ^{bc}	
Hemoglobina ($\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$) *	7,14 ± 0,85 ^a	6,28 ± 0,74 ^{abc}	5,86 ± 1,21 ^{bcd}	4,92 ± 1,39 ^d	5,51 ± 1,09 ^{cd}	6,94 ± 1,16 ^{ab}	6,19 ± 1,05 ^{bc}	
VCM (fL) ^{NS}	140,39 ± 31,85	135,76 ± 46,00	186,00 ± 118,28	197,30 ± 152,30	201,65 ± 230,85	155,00 ± 82,24	119,10 ± 22,74	
CHCM ($\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$) ^{NS}	25,05 ± 24,09	26,35 ± 26,10	26,00 ± 24,41	26,66 ± 26,07	28,05 ± 27,93	27,60 ± 26,49	29,96 ± 28,48	
PPT ($\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$) ^{NS}	6,94 ± 0,54	6,91 ± 0,62	7,00 ± 0,65	6,96 ± 0,48	6,76 ± 0,52	6,73 ± 0,64	7,00 ± 0,61	
Leucócitos totais ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	55,44 ± 15,78	35,35 ± 16,68	53,04 ± 19,15	31,48 ± 17,48	41,69 ± 25,62	59,45 ± 17,44	35,61 ± 8,73	
Trombócitos ($\times 10^2 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	46,14 ± 29,68	27,46 ± 14,58	20,13 ± 8,45	14,30 ± 4,95	21,35 ± 9,73	44,48 ± 20,22	28,49 ± 18,49	
Linfócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	52,00 ± 16,52	33,61 ± 15,95	48,00 ± 18,18	30,19 ± 16,87	39,43 ± 24,50	55,23 ± 18,48	31,34 ± 12,07	
Neutrófilos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) *	1,98 ± 1,58 ^{ab}	0,85 ± 0,91 ^b	3,14 ± 1,64 ^a	0,66 ± 0,57 ^b	1,45 ± 1,35 ^{ab}	2,53 ± 0,30 ^{ab}	3,02 ± 4,04 ^{ab}	
Monócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	1,26 ± 0,48	0,88 ± 1,15	1,90 ± 2,40	0,63 ± 0,35	0,81 ± 0,59	1,69 ± 0,86	1,24 ± 0,97	

Dez dias após a infecção experimental com *S. agalactiae*, houve diferença significativa nos leucócitos totais, trombócitos, linfócitos e neutrófilos (Tabela 4). Na contagem de leucócitos totais, os tratamentos gengibre 1,0% e 1,5%, assim como o manjeriço 0,5%, proporcionaram valores significativamente mais baixos, enquanto os outros tratamentos foram similares ao controle.

Em relação aos trombócitos, somente os peixes alimentados com gengibre 1,0% apresentaram valores mais baixos, enquanto os demais tratamentos foram similares ao controle. Os valores de linfócitos foram mais baixos do que o controle em peixes alimentados com gengibre 1,0% e 1,5% e manjeriço 0,5%. Os números de neutrófilos foram similares aos do controle em peixes alimentados com manjeriço 1,0%, mas significativamente mais baixos nos demais tratamentos.

3.5. Atividade fagocitária

Com relação à atividade fagocitária (Tabela 5), após 35 dias de suplementação, os peixes alimentados com gengibre 1,5% não diferiram do controle. Todos os demais tratamentos apresentaram valores significativamente mais altos. O mesmo ocorreu aos 55 dias de suplementação. Dez dias após a infecção experimental, somente os animais tratados com gengibre a 1,5% e manjeriço a 1,0% foram similares ao controle, enquanto os demais apresentaram percentual de fagocitose significativamente mais alto, com os valores mais altos entre os peixes que receberam manjeriço a 0,5% e 1,5% e gengibre a 0,5%.

3.6. Parâmetros imunológicos do soro

Com relação às concentrações de proteína sérica total, imunoglobulinas e título de aglutinação, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 6).

Tabela 4 - Parâmetros hematológicos (média ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo dez dias após infecção com *Streptococcus agalactiae*. VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT= proteína plasmática total. Letras distintas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%

Parâmetros	Zingiber officinale					Ocimum gratissimum				
	Controle 0%	0,5%	1,0%	1,5%	1,0%	0,5%	1,0%	1,5%	1,0%	1,5%
Eritrócitos ($\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	2,03 ± 0,33	1,86 ± 0,41	1,80 ± 0,52	1,63 ± 0,45	1,84 ± 0,49	1,76 ± 0,55	1,99 ± 0,45			
Hematócrito (%) [*]	28,67 ± 5,84 ^{ab}	32,89 ± 5,31 ^a	29,41 ± 7,77 ^{ab}	27,13 ± 5,39 ^{ab}	28,80 ± 8,56 ^{ab}	25,44 ± 6,65 ^b	26,21 ± 6,54 ^{ab}			
Hemoglobina (g.dL ⁻¹) ^{NS}	8,07 ± 0,80	8,07 ± 0,97	7,64 ± 1,41	7,67 ± 0,83	7,84 ± 1,17	7,72 ± 1,10	8,12 ± 1,03			
VCM (fL) ^{NS}	144,03 ± 5,73	183,58 ± 2,37	170,68 ± 0,90	177,56 ± 9,69	164,04 ± 52,36	158,52 ± 80,61	137,05 ± 46,71			
CHCM (g.dL ⁻¹) [*]	29,30 ± 6,91 ^{ab}	24,96 ± 3,97 ^b	27,36 ± 7,47 ^{ab}	29,53 ± 7,72 ^{ab}	28,79 ± 6,99 ^{ab}	31,84 ± 5,94 ^{ab}	32,46 ± 7,14 ^a			
PPT (g.dL ⁻¹) ^{NS}	6,65 ± 0,51	6,45 ± 0,50	6,65 ± 0,57	6,57 ± 0,44	6,90 ± 1,09	6,63 ± 0,54	7,09 ± 0,85			
Leucócitos totais ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	41,12 ± 11,98	39,60 ± 19,82	39,29 ± 14,59	47,04 ± 14,92	52,89 ± 17,24	48,41 ± 24,85	48,31 ± 22,05			
Trombócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	29,60 ± 14,75	24,09 ± 9,22	23,62 ± 13,54	30,86 ± 18,17	36,12 ± 21,48	36,06 ± 16,47	26,24 ± 8,73			
Linfócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	37,12 ± 10,48	36,40 ± 18,31	37,29 ± 14,10	44,33 ± 14,58	51,06 ± 16,45	43,52 ± 24,46	44,46 ± 20,67			
Neutrófilos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) [*]	2,50 ± 1,63 ^{ab}	1,87 ± 1,53 ^{ab}	1,24 ± 0,84 ^b	2,25 ± 3,31 ^{ab}	1,25 ± 1,56 ^b	4,19 ± 2,18 ^a	2,96 ± 2,29 ^{ab}			
Monócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ^{NS}	1,13 ± 0,97	1,27 ± 1,34	0,71 ± 0,45	0,37 ± 0,38	0,58 ± 0,54	0,69 ± 0,93	0,87 ± 1,06			

Tabela 5- Percentual de fagocitose (media \pm desvio padrão) no sangue de tilápias-do-nylo no sangue de tilápias-do-nylo aos 35 e 55 dias de suplementação com óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale*) e manjerição-cravo (*Ocimum gratissimum*) e dez dias após desafio experimental com *Streptococcus agalactiae*. Letras distintas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Tratamentos	Fagocitose (%)		
	35 dias *	55 dias *	10 dias pós-desafio *
Controle	7,25 \pm 1,76 ^c	8,00 \pm 4,08 ^c	13,50 \pm 5,26 ^d
Gengibre 0,5%	35,38 \pm 16,45 ^b	35,00 \pm 14,31 ^{ab}	35,25 \pm 12,71 ^{abc}
Gengibre 1,0%	65,33 \pm 5,25 ^a	53,33 \pm 7,64 ^a	55,67 \pm 6,66 ^a
Gengibre 1,5%	28,17 \pm 3,40 ^{bc}	20,67 \pm 3,21 ^{bc}	21,33 \pm 5,03 ^{cd}
Manjerição-cravo 0,5%	40,17 \pm 13,36 ^{ab}	43,67 \pm 10,79 ^{ab}	45,67 \pm 11,59 ^{ab}
Manjerição-cravo 1,0%	33,50 \pm 18,43 ^b	30,33 \pm 16,74 ^{ab}	31,33 \pm 13,61 ^{bcd}
Manjerição-cravo 1,5%	28,38 \pm 18,35 ^b	34,25 \pm 25,22 ^{ab}	37,00 \pm 22,73 ^{abc}

Tabela 6 – Parâmetros imunológicos do soro (media \pm desvio padrão) de tilápias-do-nylo após 35 e 55 dias de suplementação com óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale*) e manjerição-cravo (*Ocimum gratissimum*).

Tratamentos	Proteína sérica total (mg.mL ⁻¹)		Imunoglobulinas (mg.mL ⁻¹)		Título de aglutinação (log ₂ (x+1))	
	35 dias ^{NS}	55 dias ^{NS}	35 dias ^{NS}	55 dias ^{NS}	35 dias ^{NS}	55 dias ^{NS}
Controle	48,93 \pm 9,93	51,19 \pm 17,64	27,71 \pm 2,67	33,44 \pm 12,32	0,90 \pm 0,31	0,71 \pm 0,20
Gengibre 0,5%	59,30 \pm 26,99	51,78 \pm 10,23	36,26 \pm 13,68	32,86 \pm 10,28	0,95 \pm 0,00	0,70 \pm 0,00
Gengibre 1,0%	55,42 \pm 5,08	42,79 \pm 6,46	36,57 \pm 1,41	29,94 \pm 5,90	0,95 \pm 0,00	0,70 \pm 0,00
Gengibre 1,5%	44,79 \pm 4,87	42,41 \pm 1,79	24,55 \pm 8,80	26,67 \pm 1,67	0,89 \pm 0,13	0,63 \pm 0,13
Manjerição 0,5%	45,02 \pm 13,10	37,89 \pm 4,00	28,78 \pm 10,31	24,69 \pm 3,49	1,53 \pm 0,82	0,70 \pm 0,00
Manjerição 1,0%	55,64 \pm 10,53	43,14 \pm 4,37	37,45 \pm 16,48	26,23 \pm 2,18	1,24 \pm 0,40	0,59 \pm 0,16
Manjerição 1,5%	52,33 \pm 10,16	44,17 \pm 5,39	33,74 \pm 6,51	28,35 \pm 3,43	0,83 \pm 0,18	0,55 \pm 0,13

3.7. Mortalidade após o desafio

Após o desafio experimental, peixes de todos os tratamentos apresentaram os sinais clínicos característicos da infecção por *S. agalactiae*, como manchas e petéquias na superfície do corpo, natação errática, ascite e anorexia (Chen et al., 2012). Desde o primeiro dia após o procedimento de desafio, a maior parte dos peixes cessou a alimentação. Somente alguns peixes continuaram a se alimentar, em tanques correspondentes aos tratamentos manjericão 1,0% e 1,5% e gengibre 0,5%. As taxas de mortalidade e a porcentagem de sobrevivência relativa (PRS) estão apresentadas na Tabela 7. O único tratamento com mortalidade mais baixa do que o controle foi o gengibre 0,5% (Fig. 2), entretanto, não foram observadas diferenças significativas. A bactéria *S. agalactiae* foi reisolada das amostras de cérebro, rim e cérebro, confirmando o postulado de Koch.

Tabela 7 – Mortalidade e porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) em tilápias-do-nilo dez dias após desafio com *Streptococcus agalactiae*.

Tratamento	Mortalidade (%) ^{NS}	PRS (%) ^{NS}
Controle	2,86	-
Gengibre 0,5%	0,00	100
Gengibre 1,0%	3,81	-33,22
Gengibre 1,5%	5,71	-99,65
Manjericão-cravo 0,5%	3,81	-33,22
Manjericão-cravo 1,0%	4,76	-66,43
Manjericão-cravo 1,5%	5,00	-74,83

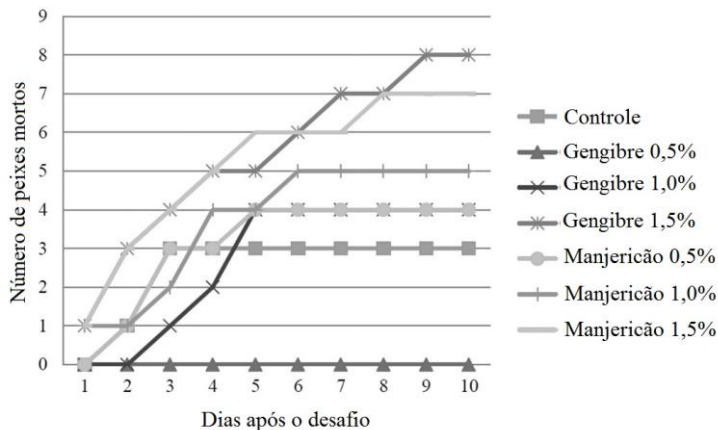


Fig. 2. Número de peixes mortos por tratamento, dez dias após desafio com *Streptococcus agalactiae*.

4. Discussão

Em relação à sua composição, o óleo essencial de manjeriço-cravo foi diferente do encontrado em outros estudos, que relataram o eugenol como principal componente (Silva et al., 2012; Ribeiro et al., 2016). No presente estudo, o principal componente foi o 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol, que possui propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Zhang et al., 2013). Não foram encontrados outros estudos relatando o 1,8-cineol como principal componente do óleo essencial de manjeriço-cravo. Porém, diferenças na composição podem ocorrer, considerando que os componentes do óleo são resultantes de produtos metabólicos vegetais. Alguns componentes podem se transformar em outros, até mesmo após a extração do óleo (Ribeiro et al., 2016). No óleo essencial de gengibre, o principal componente foi o citral, que possui fortes propriedades antimicrobianas e potencial para uso como suplemento na dieta para tratar infecções em animais de produção (Yang et al., 2016).

A suplementação com óleo essencial de manjeriço-cravo a 0,5% proporcionou melhoria no fator de conversão alimentar e no ganho de peso. Entre as doses testadas, a de 0,5% a mais próxima do ideal para promover o crescimento, sendo que as concentrações mais altas não produziram este efeito.

Não há estudos prévios que testem os efeitos de extratos de manjeriço-cravo sobre o crescimento em peixes. Porém, resultados similares foram observados em garoupas (*Epinephelus tauvina*) alimentadas com extrato metanólico de manjeriço-santo (*Ocimum sanctum*) por 12 semanas, mostrando incremento significativo na TCE e no FCA (Sivaram et al., 2004).

Com relação ao crescimento, o presente resultado difere do encontrado por outros autores, que relataram melhorias no ganho de peso, TCE e FCA em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Nya e Austin, 2009) e garoupas (*E. tauvina*) (Punitha et al., 2008) alimentadas com gengibre em pó a concentrações entre 0,1% e 1,0%. Porém, esturjões (*Huso huso*) cujas dietas foram suplementadas com gengibre em pó a 1% por 60 dias não mostraram diferenças no crescimento e conversão alimentar, corroborando o presente resultado (Kanani et al., 2014). Os efeitos negativos observados nos peixes que receberam dieta com óleo essencial a 1,5% estão provavelmente relacionados à toxicidade causada por esta dose.

Estudos prévios com trutas arco-íris (*O. mykiss*) (Nya e Austin, 2009), robalo asiático (*Lates calcifer*) (Talpur et al., 2013) e esturjão (*H. huso*) (Kanani et al., 2014) mostraram aumento no percentual de hematócrito após suplementação com gengibre, o que coincide com a tendência a aumento observada nos peixes alimentados com gengibre a 0,5% aos 35 dias. A relação inversa entre o hematócrito e a CHCM deve-se à inserção do hematócrito como denominador na fórmula de cálculo do CHCM. Os valores de hemoglobina foram similares em todos os tratamentos. Diferenças significativas na CHCM são devidas à diferença no hematócrito entre os tratamentos.

A suplementação com manjeriço-cravo a 1,0% proporcionou os valores mais baixos de hematócrito e os mais altos de neutrófilos aos 35 dias. É possível inferir que esta redução seja causada pelo gasto de energia direcionado à produção de células de defesa – neste caso, neutrófilos. Adel et al. (2015) também observaram incremento significativo nos neutrófilos no ciprinídeo *Rutilus frisii kutum* após suplementação dietária com hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), afirmando que houve estimulação da resposta imune inata.

A suplementação dietária com gengibre em pó causou aumento no hematócrito em robalo asiático (*L. calcifer*) (Talpur et al., 2013), truta arco-íris (*O. mykiss*) (Nya e Austin, 2009) e esturjão (*H. huso*) (Kanani et al., 2014), contrariando o presente resultado aos

55 dias. A redução simultânea no número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina é indicativo de anemia nos peixes alimentados com gengibre a 1,5%. Gabor et al. (2012) também relataram anemia caracterizada por redução no hematócrito e no número de eritrócitos em carpa-comum (*Cyprinus carpio*) alimentada com gengibre em pó a 1% durante 93 dias, o que poderia ser devido ao tempo prolongado deste tratamento. No presente estudo, o tempo de suplementação foi mais curto (55 dias), mas produziu efeito similar. É possível supor que o óleo essencial possua maior proporção de compostos ativos em comparação com o gengibre em pó, uma vez que componentes estruturais da planta, como as fibras, estão ausentes no óleo. Desta forma, é necessário ajustar a dose ao período de fornecimento, para evitar efeitos tóxicos devidos ao excesso.

O aumento no número de neutrófilos em peixes alimentados com gengibre 1,0% aos 55 dias pode ser explicado como estimulação da resposta imune inata, por incremento na produção de neutrófilos. Nya e Austin (2009) também observaram aumento no número de neutrófilos em trutas arco-íris (*O. mykiss*) tratadas com gengibre em pó, reforçando esta hipótese. Em relação aos resultados pós-infecção, os valores de leucócitos totais nos animais alimentados com manjerição a 0,5% e gengibre a 1,0% e 1,5% foram significativamente mais baixos do que no controle. Pode-se supor que estes tratamentos tenham estimulado a migração de leucócitos para os locais acometidos pela infecção. Por outro lado, Alsaid et al. (2015) observaram aumento no número de leucócitos totais no sangue de tilápias híbridas (*Oreochromis* sp.) infectadas com *S. agalactiae*, afirmando que durante infecções bacterianas esta é uma resposta natural do sistema imune inata, induzida pela presença do patógeno. Portanto, outra hipótese é que esta resposta tenha sido incrementada nos peixes tratados com gengibre a 0,5%, que apresentaram discreto incremento no número de leucócitos totais.

Em relação aos trombócitos, somente os peixes alimentados com gengibre a 1,0% tiveram valores significativamente mais baixos, enquanto os demais tratamentos apresentaram-se similares ao controle. Nya e Austin (2009) relataram que a suplementação dietária com gengibre não alterou a contagem de trombócitos no sangue de trutas arco-íris (*O. mykiss*), ao contrário do presente estudo. Este resultado pode também sugerir que nos peixes alimentados com gengibre a 1,0% a migração de trombócitos para os locais injuriados pela infecção tenha sido intensificada.

Os valores de linfócitos foram mais baixos em peixes alimentados com manjeriço a 0,5%, gengibre a 1,0% e 1,5%. Barroso et al. (2014) também observaram redução no número de linfócitos em linguados (*Solea senegalensis*) alimentados com probióticos e desafiados com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Os autores sugeriram que o aditivo pode ter estimulado a migração de linfócitos para os tecidos onde as bactérias se concentram, a fim de liberar anticorpos. Santos et al. (2001) observaram linfócitos secretando anticorpos em tecido branquial de robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) após banho de imersão com bacterina de *P. damsela* var. *piscicide*. Com exceção dos animais tratados com manjeriço a 1,0%, todos os peixes cuja dieta foi suplementada com óleo essencial apresentaram valores de neutrófilos mais baixos do que o controle. Pode-se assumir que os óleos essenciais tenham proporcionado aumento na migração destas células para tecidos injuriados pela infecção (Secombes e Fletcher, 1992).

Todas as dietas suplementadas proporcionaram aumento na atividade fagocitária, com exceção do gengibre a 1,5%. Considerando as propriedades altamente imunoestimulantes do gengibre (Dugenci et al., 2003), pode-se supor que a dieta suplementada com o óleo de gengibre a 1,5% durante 55 dias tenha causado exaustão dos mecanismos de defesa, devido à ativação excessiva e prolongada. Dez dias após o desafio, nota-se que o manjeriço a 1,0% proporcionou atividade fagocitária mais baixa em comparação com outras concentrações deste óleo. Este tratamento mostrou maiores valores de neutrófilos no sangue, o que poderiam explicar a menor porcentagem de células apresentando fagocitose, uma vez que havia mais células fagocíticas para capturar a mesma quantidade de bactérias. Em um estudo com trutas arco-íris, a suplementação dietária com 0,1% e 1% de gengibre em pó por 3 semanas aumentou a atividade fagocitária no sangue (Dugenci et al., 2003), corroborando o presente resultado. Em geral, o período de suplementação de 55 dias é mais recomendado para promover o ganho de peso, enquanto para prevenção de enfermidades um período mais curto é suficiente, considerando que aos 35 dias já havia diferença significativa nas funções imunológicas.

Não houve diferença significativa nos parâmetros imunológicos do soro. Mudanças nas concentrações de proteína sérica são causadas principalmente por alterações no volume plasmático, portanto, qualquer estresse que induza esta situação pode

alterar os valores de proteína total (Melo et al., 2009). A similaridade dos peixes tratados com o controle indica que a suplementação com óleos essenciais não afetou o equilíbrio osmótico do plasma. A aglutinação de patógenos é mediada principalmente pelas imunoglobulinas (Swain et al., 2006). Portanto, a capacidade de aglutinação permaneceu inalterada porque entre os tratamentos porque não houve diferença na concentração de imunoglobulinas.

Um dia após o desafio a mortalidade teve início, confirmando o rápido progresso da infecção relatado por Figueiredo et al. (2006). Em geral, as taxas de mortalidade foram baixas e somente a do tratamento gengibre 0,5% foi mais baixa do que a do controle. Como resultado, os demais peixes que receberam ração suplementada apresentaram valores negativos de PRS. Baixas taxas de mortalidade foram previamente relatadas por Dong et al. (2015), que infectaram juvenis de tilápia com *S. agalactiae* isolada de um surto de mortalidade em tilápias cultivadas. Vinte e nove cepas de *S. agalactiae* foram isoladas de surtos em fazendas de tilápia em seis estados do Brasil, e constatou-se as mortalidades ocorreram somente em peixes acima de 50 g (Mian et al., 2009). Os peixes do presente estudo ainda estavam abaixo desta faixa de peso, o que poderia explicar as baixas taxas de mortalidade. Ademais, a temperatura média nos dias pós-desafio foi de 26,2 °C, enquanto as mortalidades por *S. agalactiae* costumam ocorrer em temperatura acima de 27 °C (Leal, 2008 apud Marcusso et al., 2015). Apesar da baixa mortalidade, o isolado foi capaz de causar enfermidade nos peixes, o que foi confirmado pelo postulado de Koch e pela observação dos sinais clínicos típicos da estreptococose em todos os peixes desafiados. Em pisciculturas, surtos causados por *S. agalactiae* são geralmente observados em situações de estresse térmico, quando os peixes se tornam mais susceptíveis à enfermidade. Para a tilápia-donilo, Marcusso et al. (2015) relataram que temperaturas abaixo de 24 °C ou acima de 32 °C produziram aumento significativo nas taxas de mortalidade em infecção com *S. agalactiae*. Desta forma, sugere-se que, apesar da baixa virulência do isolado, as baixas taxas de mortalidade ocorreram devido à temperatura, que poderia ter sido elevada a 32 °C após o desafio para produzir mortalidades mais significativas. A sobrevivência dos peixes foi possivelmente favorecida pela temperatura, que se manteve dentro da faixa de conforto térmico para a espécie.

5. Conclusões

O óleo essencial de manjeriçãocravo (0,5%) proporcionou melhor crescimento e ganho de peso durante o período experimental. Os óleos essenciais de manjeriçãocravo e gengibre incrementaram a resposta imune contra *S. agalactiae*, patógeno responsável por grandes perdas na tilapicultura. Para ambos os óleos, as concentrações mais altas (1,5%) produziram efeitos adversos.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (MP2-01/2012) pelo auxílio financeiro, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado a A. Brum, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e bolsa a M. L. Martins (CNPq 305869/2014-0), à Nicoluzzi Rações (Penha-SC) pela ração utilizada no experimento, ao Laboratório Acquapiscis pela cepa bacteriana utilizada no desafio, ao Dr. Felipe do Nascimento Vieira (Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC) e ao Dr. Robert Lenocho (Instituto Federal Catarinense, IFC) pela revisão crítica do manuscrito antes da submissão.

7. Referências

Absali, H., Mohamad, S., 2010. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants. J. Anim. Vet. Adv. 9 (13), 1839-1847.

Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4th ed. Allured Publishing Co, Carol Stream, Illinois.

Adel, M., Amin, A.A., Zorriehzahra, J., Nematollahi, A., Esteban, M.A., 2015. 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. 45 (2), 841-847.

Ali, B.H., Blunden, G., Tanira, M.O., Nemmar, A., 2008. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. Food Chem. Toxicol. 46, 409-420.

Alsaid, M., Abuseliana, A.F., Daud, H.H., Mustapha, N.M., Bejo, S.K., Abdelhadi, Y.M., Hamdan, R.H., 2015. Haematological, biochemical and clinical signs changes following experimental infection of *Streptococcus agalactiae* in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). Basic Res. J. Agricult. Sci. Rev. 4 (9), 289-285.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., Watanabe, T., 2000. Effect of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish. Sci. 66, 1068-1075.

Amend, D. 1981. Potency testing of fish vaccines. Dev. Biol. Stand., 49, 447-454.

Antache, A., Cristea, V., Grecu, I., Dediu, L., Cretu, M., Petrea, S.M., 2014. The influence of some phytobiotics on haematological and some biochemical indexes at *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol. 47 (1), 192-199.

Anyanwu, D.C., Orusha, J.O., Offor, J.I. 2012. Effects of *Ocimum gratissimum* leaf meal on carcass composition and quality of *Clarias gariepinus*. Pak. J. Nutr. 11 (6): 532-535.

Barroso, C., Ozório, R.O.A., Afonso, A., Moraes, J.R.E., Costas, B., 2014. Immune responses and gut morphology in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed dietary probiotic supplementation and following exposure to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Aquac. Res. 47 (3), p. 951-960.

Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. 5, 771-781.

Boijink, C.L., Queiroz, C.A., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Inoue, L.A.K.A., 2016. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). Aquaculture 457, 24-28.

Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish Shellfish Immunol. 19, 457-472.

Bulfon, C., Volpatti, D., Galeotti, M., 2015. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. Aquac. Res. 46, 513-551.

Cai, W.Q., Li, S.F., Ma, J.Y., 2004. Disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia x male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. Aquaculture. 229, 79-87.

Chen, M., Li, L.P., Wang, R., Liang, W.W.; Huang, Y.; Li, J.; Lei, A.Y.; Huang, W.Y., Gan, X., 2012. PCR detection and PFGE

genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China. *Vet. Microbiol.* 159, 526-530.

Coimbra, J.L., Soares, A.C.F., Garrido, M.S., Souza, C.S., Ribeiro, F.L.B., 2006. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. *Pesq. Agropec. Bras.* 41 (7), 1209-1211.

Dairiki, J.K., Majolo, C., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Oliveira, M.R., Morais, I.S., 2013. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100643/1/Circ-Tec-42.pdf> (accessed 02.05.16)

Dong, H.T., Nguyen, V.V., Le, H.D., Sansuriya, P., Jitrakorn, S., Saksmerprome, V., Senapin, S., Rodkhum, C., 2015. Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. *Aquaculture.* 448 (1), 427-435.

Dotta, G., Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Pilati, C., Bezerra, A.J.M., Morán, R., 2011. Acute inflammatory response in Nile tilapia fed *Lactobacillus plantarum* in the diet. *Acta Sci. Biol. Sci.* 33, 239-246.

Dugenci, S.K., Arda, N., Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *J. Ethnopharmacol.* 88, 99–106

Evans, J.J., Klesius, P.H., Pasnik, D.J., Bohnsack, J.F., 2009. Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerg. Infect. Dis.* 15 (5), 774-746.

FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture: 2014. Rome. <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf> (accessed 13.06.2016)

Figueiredo, H.C.P., Carneiro, D.O., Faria, F.C., Costa, G.M., 2006. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58 (4), 678-680.

Fu, C., Cui, Y., Hung, S.S.O., Zhu, Z., 1998. Growth and feed utilization by F4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *J. Fish Biol.* 53, 115-129.

Gabor, E.; Aurel, S., Bentea, M., Maldarasanu, T., Arion, A., 2012. The effects of some phytoadditives on growth performances and blood parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) L. juveniles. *Bull. UASVM Anim. Sci. Biotechnol.* 69, p. 1-2.

Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P., Hall, E., Brosius, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.* 56, 35-39.

Haniffa, M.A., Kavitha, K., 2012. Antibacterial activity of medicinal herbs against the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. J. Agricult. Technol. 8 (1), 205-211.

Harikrishnan, R.; Balasundaram, C., Heo, M.S., 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 28, 354-361.

Ishikawa, N.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Lombardi, J.V., 2008. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. Arch. Vet. Sci. 13, 54-63.

Kanani, H.G., Nobahar, Z., Kakoolaki, S., Jafarian, H., 2014. Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. Fish Physiol. Biochem. 40, 481-490.

Kotzekidou, P., Giannakids, P., Boulamatsis, A., 2007. Antimicrobial activity of some plants extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. Food Sci. Technol. 41, 119-127.

Li, Y.W., Liu, L., Huang, P.R., Fang, W., Luo, Z.P., Peng, H.L., Wang, Y.X., Li, A.X., 2014. Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae*. J. Fish Dis. 37, 757-763.

Marcusso, P.F., Aguinaga, J.Y., Claudiano, G.S., Eto, S.F., Fernandes, D.C., Mello, H., Marinho Neto, F.A., Salvador, R., Moraes, J.R.E., Moraes, F.R., 2015. Influence of temperature on *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 52 (1), 57-62.

McLafferty, F. W.; Stauffer, D. B. Registry of Mass Spectral Data, 6th Electronic Edition; Wiley: New York, 1994.

Melo, D.C., Oliveira, D.A.A, Melo, M.M., Junior, D.V., Teixeira, E.A., Guimarães, S.R., 2009. Proteic electrophoretic profile of chitralada tilapia nilotic (*Oreochromis niloticus*), exposed to hypoxia chronic stress. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61(5), 1183-1190.

Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M., Figueiredo, H.C.P., 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. Vet. Microbiol. 136, 180-183.

MSD Animal Health, 2012. Technical Bulletin: *Streptococcus* in the tilapia environment. <http://aqua.merck-animal->

health.com/binaries/AquaVac_StreSa_tech01_0Nov12_050STREP_tcm56-35564.pdf (accessed 31.05.2016)

Nya, E.J., Austin, B., 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Fish Dis. 32, 971-977.

Orafidiya L.O., Agbani E.O., Iwalewa E.O., 2004. Adelusola K.A., Oyedapo O.O. Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. Phytomedicine. 11, 71-76.

Punitha, S.M.J, Babu, M.M., Sivaram, V., Shankar, V.S., Dhas, S.A., Mahesh, T.C., Immanuel, G., Citarasu, T., 2008. Immunostimulating influence of herbal medicines on nonspecific immunity in grouper *Epinephelus tauvina* juvenile against *Vibrio harveyi* infection. Aquac. Int. 16 (6), 511-523.

Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Eduem, Maringá (140 pp.)

Ribeiro, A.S., Batista, E.S., Dairiki, J.K., Chaves, F.C.M., Inoue, L.A.K.A., 2016. Anesthetic properties of *Ocimum gratissimum* essential oil for juvenile matrinxã. Acta Sci. Anim. Sci. 38 (1), 1-7.

Santos, M.M., Taverne-Thiele, J.J., Barnes, A.C., Van Muiswinkel, W.B., Ellis, A.E., Rombout, J.H., 2001. The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *Piscicida* bacterin: an ontogenetic study. Fish Shellfish Immunol. 11, 65-74.

Secombes, C.J., Fletcher, T.C., 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. Annu. Rev. Fish Dis. 2, 53-71.

Silva, L.D.L., Parodi, T.V., Reckziegel, P., Garcia, V.D.O., Bürger, M.E., Baldisserotto, B., Malmann, C.A., Pereira, A.M.S., Heinzmann, B.R., 2012. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. Aquaculture. 350, 91-97.

Sivaram, V., Babu, M.M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T., Marian, M.P., 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. Aquaculture. 237, 9-20.

Sutuli, F.J., Gatlin III, D.M., Rossi Jr., W., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2016. In vitro effects of plant essential oils on non-specific immune parameters of red drum, *Sciaenops ocellatus* L. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. doi:10.1111/jpn.12488

Swain, P., Sahoo, P.K., Ayyapan, S., 2006. Fish and Shellfish Immunology: An introduction. Narendra Publishing House, Delhi.

Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., Bolong, A.M.A., 2013. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. Aquaculture 400, 46-52.

Weichselbaum, C.T.E., 1946. An accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. Am. J. Clin. Pathol. 16(3), 40-49.

Yang, Y., Wang, Q., Diarra, M.S., Yu, H., Hua, Y., Gong, J., 2016. Functional assessment of encapsulated citral for controlling necrotic enteritis in broiler chickens. Poult. Sci. 95 (4), 780-789.

Yildirim, M., Lim, C., Wan, P., Klesius, P.H., 2003. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing grade levels of gossypol-acetic acid. Aquaculture. 219, 751-768.

Zhang, L.J., Xue, Y., Zhang, C.R., Hu, S.H., 2013. Antibacterial and anti-inflammatory effects of eucalyptol. Chin J. Vet. Drug. 3, 1-8.

CAPÍTULO II

Parâmetros bioquímicos do sangue e centros de melanomacrófagos em tilápias-do-nilo após suplementação dietária com óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre

“Blood biochemical parameters and melanomacrophages centers in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger”

Aline Brum^a, Scheila Anelise Pereira^a, Lucas Cardoso^a, Edsandra Campos Chagas^b, Francisco Célio Maia Chaves^b, José Luiz Pedreira Mouriño^a, Maurício Laterça Martins^a

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

^b EMBRAPA Amazônia Ocidental, Rod. AM 010, km 29, Zona Rural, 69010-970 Manaus, AM, Brasil.

* Autor correspondente: A. Brum. Laboratório AQUOS- Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

Artigo redigido conforme as normas do periódico “*Fish and Shellfish Immunology*” (ISSN: 1050-4648)

Resumo

Atualmente a tilápia-do-nylo é a espécie de água doce mais cultivada no mundo, porém, surtos de enfermidades causam grandes perdas na produção. Neste contexto, é crescente o interesse por produtos naturais para aumentar a resistência a patógenos, porém sem causar prejuízo fisiológico aos peixes. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da inclusão de óleos essenciais de manjerição-cravo (*Ocimum gratissimum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) sobre o estado fisiológico e parâmetros imunológicos na dieta de tilápia-do-nylo. Após 35 e 55 dias de alimentação com dietas suplementadas (0,5%, 1,0% e 1,5%), foi feita coleta de sangue para determinação de metabólitos sanguíneos (glicose, colesterol, triglicerídeos, proteína sérica total e imunoglobulinas) e atividade da lisozima. Também foram coletadas amostras de baço aos 55 dias, para análise da formação de centros de melanomacrófagos. Aos 35 dias, o colesterol mostrou redução nos tratamentos gengibre 0,5% e 1,5% e manjerição 1,5%. Os triglicerídeos séricos mostraram redução nestes mesmos tratamentos, além do manjerição 1,5%. Aos 55 dias todos os animais cuja ração foi suplementada mostraram redução para ambos os parâmetros. A atividade da lisozima aos 35 dias foi significativamente maior nos peixes tratados com gengibre a 1,0% e aos 55 dias não houve diferença entre os tratamentos. Quanto aos centros de melanomacrófagos, aos 35 dias apresentaram-se mais numerosos nos peixes tratados com manjerição a 0,5%, porém, sem diferença significativa na área percentual do baço ocupada pelos centros. Não houve diferença significativa nos níveis de glicose, proteína sérica total e imunoglobulinas. A adição de óleos essenciais mostrou ser útil na melhora do estado fisiológico dos peixes, sem ativação excessiva dos mecanismos de defesa.

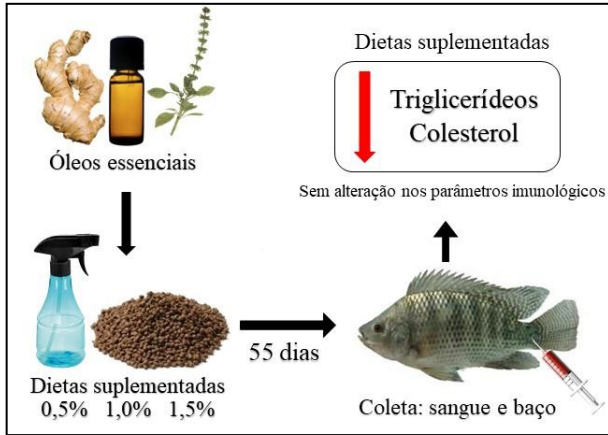
Palavras-chave: triglicerídeos, colesterol, lisozima, imunoglobulinas, baço

Abstract

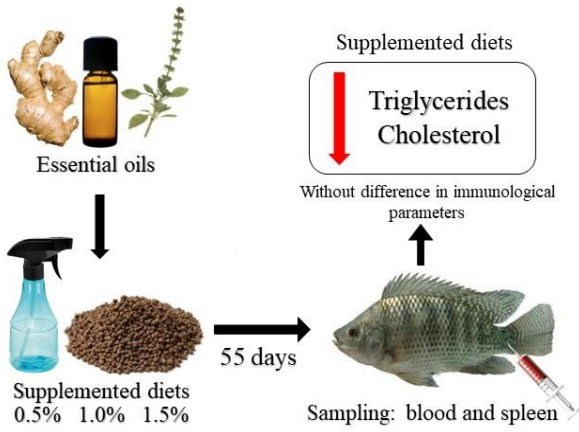
Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most farmed freshwater fish in the world, however, disease outbreaks are the main cause of losses in production. Due to this, there is an increasing interest in natural products for enhancing disease resistance, without causing physiological impairment. The aim of this study was to verify the effect of the essential oils of clove basil (*Ocimum gratissimum*) and ginger (*Zingiber officinale*) on physiological and immunological parameters of Nile tilapia. After 35 and 55 days of supplementation (0.5%, 1.0% and 1.5%), blood collection was performed for determination of metabolites (glucose, cholesterol, triglycerides, serum total protein and immunoglobulins) and lysozyme activity. Spleen tissue was also collected at 55 days for analyzing melanomacrophages centers. At 35 days, cholesterol showed reduction in the treatments 0.5% and 1.5% ginger and 1.5% clove basil. The serum triglycerides showed reduction in these same treatments, in addition to 1.0% clove basil. At 55 days all the supplemented groups showed reduction for both parameters. The lysozyme activity at 35 days was significantly higher in fishes supplemented with 1.0% ginger and showed no difference among the treatments at 55 days. Regarding the melanomacrophages centers, at 35 days increased number in fish supplemented with 0.5% clove basil was observed but with no significant difference in the total percentual area of spleen occupied by centers. The levels of glucose, total serum protein and immunoglobulins did not show significant differences in both sampling times. The addition of essential oils showed to be useful for improving physiological status of the fish, without excessive activation of defense mechanisms.

Keywords: triglycerides, cholesterol, lysozyme, immunoglobulins, spleen

Resumo gráfico



Graphical abstract



Destaques

- Óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre foram adicionados à dieta de tilápia-do-nilo durante 55 dias.
- Após 55 dias de suplementação, ambos os óleos proporcionaram redução significativa dos níveis séricos de colesterol e triglicérides.
- Os parâmetros imunológicos não foram ativados desnecessariamente ao final do período de suplementação.

1.Introdução

O pescado vem despontando como importante fonte de proteína animal para a alimentação humana, sendo grande parte da produção originária da piscicultura [1]. Neste cenário, destaca-se a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.), peixe de água doce mais cultivado no mundo, devido à sua rusticidade, desempenho zootécnico satisfatório e adequação às exigências do mercado. Entretanto, enfermidades têm sido responsáveis por grandes perdas na tilapicultura, principalmente relacionadas a infecções bacterianas [1,2].

O tratamento de enfermidades na piscicultura é comumente feito com produtos químicos sintéticos, porém, eles trazem inconvenientes relacionados à sua alta toxicidade, contaminação de corpos d'água e do pescado destinado ao consumo humano, bem como a seleção de patógenos resistentes aos tratamentos convencionais [3]. Como alternativa, produtos naturais têm sido investigados em relação a suas propriedades imunomoduladores, a fim de incrementar a resposta imune dos peixes e torná-los mais resistentes a uma ampla gama de enfermidades [4]. As plantas produzem, por meio de seu metabolismo secundário, produtos que são capazes de interferir em mecanismos imunológicos no organismo dos animais, proporcionando rápida ativação dos mecanismos imunológicos frente a um patógeno [5].

Entre as plantas que apresentam compostos com propriedades terapêuticas, destacam-se as do gênero *Ocimum* (Família Lamiaceae), herbáceas de grande importância econômica que ocorrem nas áreas tropicais da África, Ásia e Américas, sendo popularmente denominadas “manjeriços” [6]. *Ocimum gratissimum* L., conhecida como alfavaca, manjeriço-cravo, ou simplesmente manjeriço, já mostrou propriedades

antimicrobianas, anestésicas, antiparasitárias, imunomoduladoras e promotoras de crescimento em peixes [7-10].

O gengibre (*Zingiber officinale*) pertence à família Zingiberaceae e seu rizoma é amplamente utilizado para prevenção e tratamento de enfermidades, por apresentar diversos compostos com propriedades imunoestimulantes, antimicrobianas e antiparasitárias [11]. O gengibre em pó incluído em dietas para peixes já proporcionou incremento nos parâmetros hemato-imunológicos, no crescimento e na resistência a enfermidades [12-15].

Óleos essenciais são uma fonte concentrada de compostos bioativos, razão pela qual alguns estudos em peixes vêm sendo realizados. A suplementação dietária com óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre para juvenis de tilápia-do-nilo já demonstrou efeitos positivos sobre a resposta imunológica contra a bactéria *Streptococcus agalaciae*, além de incremento no ganho de peso associado ao óleo de manjeriço-cravo [10]. Porém, parâmetros bioquímicos estão entre os mais importantes indicadores do estado de saúde em peixes [16]. São escassos os registros dos efeitos de óleos essenciais na dieta sobre determinados parâmetros metabólicos e imunológicos em peixes. Entre os principais componentes da resposta hemato-imunológica em peixes estão os monócitos, macrófagos e elementos da resposta imune humoral, como a lisozima [17]. A formação de centros de melanomacróforos e parâmetros fisiológicos como as concentrações sanguíneas de glicose, colesterol e triglicerídeos no sangue são importantes indicadores de higidez, bem como da influência de componentes da dieta no estado de saúde em peixes [18,19].

Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da suplementação com óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre sobre os níveis de metabólitos sanguíneos, atividade da lisozima e formação de centros de melanomacróforos em juvenis de tilápia-do-nilo.

2. Material e Métodos

2.1. Peixes e condições experimentais

Um total de 1080 juvenis de tilápia-do-nylo pertencentes à linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), com comprimento total de $3,92 \pm 0,36$ cm e peso de $1,84 \pm 0,52$ g, foi obtido junto a uma piscicultura comercial no município de Paulo Lopes, Santa Catarina, Brasil. Os peixes passaram por exame macroscópico para verificar a presença de eventuais injúrias causadas por parasitos ou outros patógenos. Dez peixes foram anestesiados com eugenol (75 mg L^{-1}) e eutanasiados por comoção cerebral (CEUA/UFSC PP008696) para análise parasitológica do muco, brânquias e órgãos internos, bem como para verificação de qualquer sinal clínico de enfermidade. Os peixes examinados não apresentaram parasitos nem sinais de infecção. Após a biometria, os peixes foram aleatoriamente distribuídos em 24 tanques circulares de fibra (100 L cada), totalizando 45 peixes por tanque. Os tanques eram conectados a um sistema de recirculação contendo filtragem mecânica, biológica e ultravioleta. Havia aeração constante, aquecedor central com termostato regulado a $26 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo controlado (12 h). Os tratamentos foram iniciados após três dias de aclimação.

Durante o período de aclimação, os peixes foram alimentados até saciedade aparente com ração comercial contendo 40% de proteína bruta (Nicoluzzi[®], Brasil). Após a aclimação, os peixes foram alimentados por 55 dias com as dietas experimentais a seguir: controle (quatro réplicas), óleo essencial de manjeriçao-cravo a 0,5% (três réplicas), 1,0% (três réplicas) e 1,5% (três réplicas) e óleo essencial de gengibre a 0,5% (três réplicas), 1,0% (três réplicas) e 1,5% (quatro réplicas), totalizando sete tratamentos em 24 unidades experimentais. A escolha das concentrações baseou-se nos resultados de estudos que utilizaram gengibre seco em pó [14, 15, 20] e extrato metanólico de manjeriçao-santo (*Ocimum sanctum*) [21] em dietas para peixes.

Os parâmetros de qualidade de água foram verificados diariamente, pela manhã e ao final da tarde. Temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, pH, salinidade, condutividade elétrica e total de sólidos em suspensão foram medidos com equipamento multiparâmetro HI-9829 (Hanna Instruments, Padova, Itália). As concentrações de amônia total, nitrito, nitrato e alcalinidade foram medidas com kits colorimétricos (Alfakit, Florianópolis, Brasil).

Ao longo do experimento os valores de temperatura foram $26,70 \pm 1,17$ °C, oxigênio dissolvido $6,36 \pm 0,47$ mg.L⁻¹, pH $7,53 \pm 0,31$, condutividade elétrica $592,70 \pm 184,97$ μS.cm⁻¹, salinidade $0,28 \pm 0,10$, amônia total $0,85 \pm 0,65$ mg.L⁻¹, nitrito $0,14 \pm 0,14$ mg.L⁻¹, nitrato $0,00 \pm 0,00$ mg.L⁻¹, alcalinidade $54,08 \pm 30,69$ mg CaCO₃.L⁻¹ e sólidos em suspensão $285,93 \pm 92,27$ mg.L⁻¹.

2.2.Extração e composição dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos e analisados nas mesmas condições apresentadas por [10] e sua composição é mostrada na Figura 1.

2.3.Preparo das dietas, alimentação e obtenção de soro

A metodologia de inclusão dos óleos na dieta, a rotina de alimentação e os procedimentos de coleta de sangue e obtenção de soro, bem como a determinação de proteínas totais e imunoglobulinas no soro, estão descritos em [10]. As coletas de sangue foram realizadas após 35 e 55 dias de suplementação, de cinco peixes de cada tanque.

2.4.Determinação da glicose plasmática

A concentração de glicose plasmática foi determinada de forma individual, imediatamente após a coleta de sangue, com glicosímetro portátil Accu-Chek® Advantage (Roche Diagnóstica, Brasil).

2.5.Parâmetros bioquímicos do soro

As concentrações de colesterol e triglicerídeos no soro foram determinadas com kits comerciais “Colesterol SL” e “Triglicerídeos” (ELITech Group®, Bélgica). Brevemente, após confecção de curva padrão, adicionou-se 3 μL de soro a 300 μL do reagente enzimático apropriado para cada amostra e após 325 s de incubação foi feita a leitura da absorbância a 550 nm.

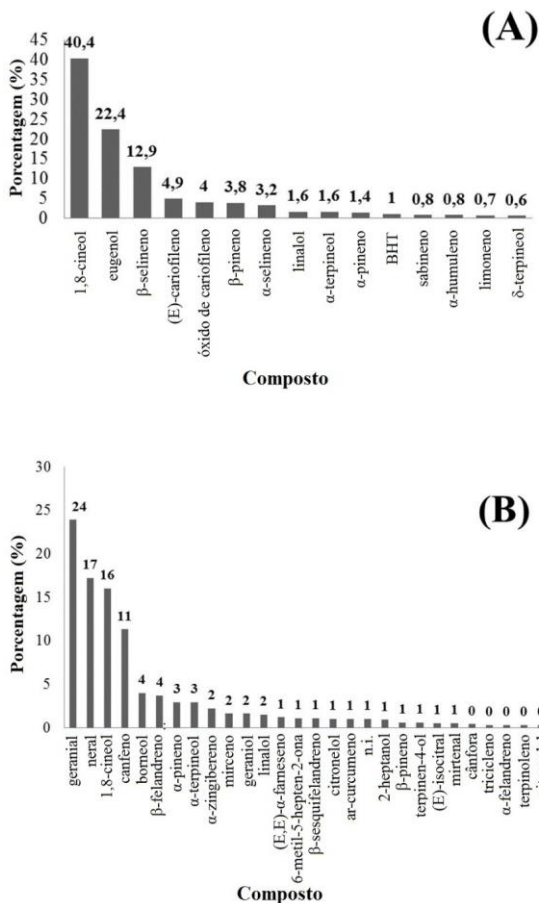


Figura 1. Composição dos óleos essenciais. A. Manjeriço-cravo (*Ocimum gratissimum*) B. Gengibre (*Zingiber officinale*). n.i. = compostos não identificados.

2.6. Atividade da lisozima

A atividade da lisozima no soro foi determinada por espectrofotometria segundo [22]. Uma suspensão de 0,02% (w/v) de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em tampão de fosfato 0,05 M (pH 6,2) foi utilizada como substrato. A lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizada como padrão. Para cada ensaio foi preparada uma nova

curva padrão. As soluções padrão, bem como as amostras, foram adicionadas ao substrato a 25°C.

2.7. Centros de melanomacrófagos no baço

Aos 55 dias de suplementação, imediatamente após a coleta de sangue, os peixes ainda anestesiados foram eutanasiados por comoção cerebral (CEUA/UFSC PP008696) para necropsia e coleta de amostras de baço, que foram fixadas em formalina tamponada 10%. Coletou-se o baço de três peixes de cada tanque, totalizando 20 peixes por tratamento.

As amostras foram desidratadas em graduação progressiva de álcool etílico, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. Com auxílio de micrótomo PAT- MR10, foram realizados cortes de 3 µm, posteriormente corados com hematoxilina de Harris e eosina (HH & E). A quantificação dos centros de melanomacrófagos no baço foi realizada pela técnica de contagem de pontos por meio da graticula de Weibel [23] acoplada a microscópio óptico, tendo a metodologia adaptada de [24].

2.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software Statistica 13.0 (Statsoft Inc., EUA). Para dados de parâmetros bioquímicos, atividade da lisozima e área dos centros de melanomacrófagos, aplicou-se ANOVA unifatorial seguida de teste de Tukey para comparação de médias entre os tratamentos. Para comparar os resultados entre os tempos de coleta (35 e 55 dias), aplicou-se o teste t de Student. A comparação do número de centros de melanomacrófagos foi feita por ranqueamento, através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para comparação de médias. Para todos os testes estatísticos, fixou-se nível de significância de 5%. Transformações de dados foram aplicadas quando necessárias.

3. Resultados

3.1. Parâmetros bioquímicos do sangue

Em ambas as coletas, não houve diferença significativa nas concentrações de glicose plasmática, proteína sérica total e imunoglobulinas entre os tratamentos (Tabela 1). Em relação às concentrações séricas de colesterol, aos 35 dias os animais tratados com

gingibre 0,5%, gengibre 1,5% e manjeriçã-cravo 1,5% apresentaram valores significativamente mais baixos do que o controle. Aos 55 dias, todos os peixes cuja dieta foi suplementada mostraram valores de colesterol significativamente mais baixos do que o controle (Tabela 1).

Quanto às concentrações de triglicerídeos no soro, aos 35 dias de suplementação os peixes alimentados com manjeriçã 1,0% e 1,5% e gengibre 0,5% e 1,0% apresentaram valores significativamente mais baixos do que o controle. Aos 55 dias, todos os animais cuja dieta foi suplementada com óleo essencial mostraram redução significativa nos triglicerídeos, em comparação com o controle (Tabela 1). Nenhum dos parâmetros mostrou diferença significativa entre os tempos de coleta.

3.2. Atividade da lisozima

Aos 35 dias não foi possível determinar a atividade da lisozima sérica nos animais tratados com gengibre a 0,5%, devido à quantidade insuficiente de amostra. Neste período, os peixes tratados com gengibre a 1,0% mostraram atividade da lisozima significativamente mais alta do que todos os demais, inclusive os do controle. Aos 55 dias, a atividade da lisozima sérica não mostrou diferença significativa entre os tratamentos e não houve diferença significativa entre os tempos de coleta (Tabela 1).

3.3. Centros de melanomacrófagos no baço

Aos 55 dias, os peixes tratados com manjeriçã a 0,5% mostraram redução significativa do número de centros de melanomacrófagos no baço, enquanto os demais animais que receberam dieta suplementada foram semelhantes ao controle (Tabela 2). Porém, com relação à área do baço ocupada pelos centros, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

4. Discussão

Ao longo do período experimental, os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se dentro da faixa de conforto fisiológico para a tilápia-do-nylo [25]. Quanto aos parâmetros sanguíneos, a concentração sanguínea de glicose é reconhecida como importante parâmetro indicador de estresse em peixes. A suplementação com óleos essenciais de casca de limão (*Citrus limon*) proporcionou redução significativa da glicose sanguínea em tilápias-de-moçambique (*O. mossambicus*),

mostrando efeito mitigador do estresse [26]. Por outro lado, observou-se aumento da glicose associado a neutrofilia em tilápias-do-nilo (*O. niloticus*) após banho antiparasitário com óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), indicando que o tratamento foi um estímulo estressante [27]. No presente estudo não houve diferença significativa na glicose sanguínea, portanto, pode-se dizer que a suplementação não foi prejudicial a ponto de causar um quadro de estresse.

Os níveis de metabólitos energéticos (triglicerídeos e colesterol) são importantes parâmetros de saúde em peixes [28]. As principais funções biológicas destes lipídios incluem o armazenamento de energia, sinalização e atuação como componentes estruturais de membranas celular. Alterações na homeostase lipídica podem originar uma série de condições patológicas na maioria das espécies de vertebrados [29]. Os triglicerídeos são geralmente utilizados como indicadores da função hepática, enquanto os níveis de colesterol total mostram o estado nutricional e possíveis disfunções no metabolismo de lipídios e lipoproteínas, especialmente no fígado [30].

A homeostase lipídica é mantida pelo equilíbrio entre aquisição (via dieta e síntese no organismo) e eliminação (via excreção) dos compostos lipídicos, sendo este equilíbrio regulado por enzimas específicas [31]. Em comparação com os mamíferos, os peixes possuem capacidade reduzida de utilização de carboidratos como fonte de energia [32], o que reflete em diferenças no metabolismo energético. Em geral, peixes teleósteos são mais propensos à hiperlipidemia e à hipercolesterolemia, em comparação com os mamíferos [33]. Por conta desta particularidade, peixes têm sido utilizados como modelo experimental no estudo de estágios iniciais de doenças cardiovasculares, bem como para verificar a bioatividade de compostos naturais sobre estas condições [34].

Em estudo com robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), observou-se níveis significativamente mais altos de colesterol e triglicerídeos séricos em peixes cultivados, quando comparados com indivíduos selvagens. Esta é, possivelmente uma alteração fisiológica provocada pela dieta artificial [28]. Os resultados do presente estudo mostram que os óleos essenciais na dieta podem amenizar este efeito, reduzindo os níveis de triglicerídeos e colesterol, o que pode ser benéfico para prevenir alterações patológicas relacionadas ao acúmulo de gordura no fígado em peixes alimentados com dieta artificial [35].

No presente estudo, os níveis séricos de colesterol e triglicerídeos mostraram redução significativa nos peixes que receberam ração suplementada com ambos os óleos. Resultado similar ocorre em

roedores após a administração dietária de extratos das plantas utilizadas no presente estudo. Ratos (*Rattus norvegicus*) cuja dieta foi suplementada com extrato aquoso de gengibre durante seis semanas apresentaram redução significativa nos níveis de colesterol plasmático [36]. Em hamsters (*Mesocricetus auratus*) com hiperlipidemia induzida após dieta rica em lipídios, dietas suplementadas com extrato aquoso de manjerição-cravo proporcionaram redução significativa nos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos [37]. Entretanto, em ambos os estudos, não foi possível esclarecer o mecanismo bioquímico responsável por este efeito, sendo possivelmente devido à influência sobre múltiplos componentes do metabolismo.

Quanto aos peixes, um estudo no qual tilápias-de-moçambique (*O. mossambicus*) receberam dieta suplementada com óleo essencial de casca de laranja-doce (*Citrus sinensis*) durante 60 dias, também houve redução significativa nos níveis de colesterol e triglicerídeos [16]. O mesmo ocorreu em *O. mossambicus* tratadas via dieta com extrato acetônico de gengibre durante 45 dias, corroborando o presente resultado [38]. O óleo essencial de manjerição, que teve como componente majoritário o 1,8-cineol, que, em sinergia com outros componentes, proporcionou redução do colesterol sérico aos 35 e 55 dias, em comparação com o controle. Do mesmo modo, um estudo com paulistinhas (*Danio rerio*) em estado de hipercolesterolemia induzida mostrou redução significativa do colesterol sérico após suplementação dietária com 1,8-cineol, possivelmente devido à intensificação do transporte reverso de colesterol, do sangue para o fígado [39].

O óleo essencial de gengibre apresentou como principal componente o citral, não havendo registros prévios do efeito deste composto em peixes. Porém, em um estudo com roedores hiperlipidêmicos, o citral isolado foi administrado oralmente durante 24 dias, tendo como resultado redução do colesterol e dos triglicerídeos no soro [40]. Concluiu-se o estudo argumentando que diversos compostos de origem vegetal possuem o efeito de reduzir a concentração de lipídios no sangue, e este efeito pode ser devido à influência dos diferentes compostos em diversos estágios da síntese e do metabolismo de lipídios [45]. Em bagres (*Clarias lazera*) cuja dieta foi suplementada com extrato de cebola (*Allium cepa*) durante 8 dias, verificou-se redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos no sangue, acompanhada de aumento destes no fígado, o que sugere mobilização de lipídios do sangue para armazenamento no tecido hepático [41]. No presente estudo, apesar das diferenças entre os tratamentos, todos os animais mostraram valores de

colesterol e triglicérides dentro dos intervalos de referência previamente registrados para tilápias em condições de higidez [42-45].

A lisozima é uma enzima antimicrobiana produzida como componente da imunidade humoral, sendo um importante parâmetro de imunidade inata em peixes [49]. O aumento da atividade da lisozima nos peixes alimentados com gengibre a 1,0% aos 35 dias, provavelmente deve-se à estimulação do sistema imune em um primeiro momento, devido às potentes propriedades imunoestimulantes do gengibre [11]. Observou-se aumento da atividade da lisozima em tilápias-de-moçambique (*O. mossambicus*) alimentadas com óleo essencial de casca de limão a 0,5% e 0,75%, corroborando o presente resultado. Porém, neste estudo, possivelmente tenha ocorrido adaptação do organismo a este estímulo, culminando na ausência de diferença neste parâmetro aos 55 dias. Similarmente, em tilápias-do-nilo alimentadas com extratos de própolis e *Aloe vera* por 21 dias, não houve alteração significativa na atividade da lisozima [48]. Futuros estudos são necessários para verificar os efeitos de doses intermediárias, bem como o comportamento da atividade da lisozima em situações de infecção experimental, após o período de suplementação.

Tabela 1 – Glicose plasmática e parâmetros bioquímicos do soro em tilápias-do-nilo tratadas com óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre, aos 35 e 55 dias de suplementação. Letras distintas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey, nível de significância de 5%.

Parâmetros	35 dias				
	Controle	Gengibre		Manjeriço	
	0%	0,5%	1,0%	1,5%	1,0%
Glicose plasmática (mg.dL ⁻¹) ^{NS}	100,25 ± 7,85	101,33 ± 3,21	101,67 ± 7,51	101,25 ± 5,12	103,33 ± 5,69
Proteína sérica total (mg.mL ⁻¹) ^{NS}	48,93 ± 9,93	59,30 ± 26,99	55,42 ± 5,08	44,79 ± 4,87	55,64 ± 10,53
Imunoglobulinas (mg.mL ⁻¹) ^{NS}	27,71 ± 2,67	36,26 ± 13,68	36,57 ± 1,41	24,55 ± 8,80	37,45 ± 16,48
Colesterol total (mg.dL ⁻¹) [*]	252,50 ± 20,21 ^a	125,67 ± 14,57 ^b	146,33 ± 35,92 ^{ab}	136,33 ± 15,82 ^b	144,67 ± 13,05 ^{ab}
Triglicédeos (mg.dL ⁻¹) [*]	78,50 ± 12,48 ^a	46,00 ± 8,19 ^b	48,67 ± 4,04 ^b	57,75 ± 16,36 ^{ab}	46,67 ± 7,64 ^b
Atividade da lisozima (U.mL ⁻¹) [*]	1136,26 ± 641,43 ^b	-	3660,99 ± 0,00 ^a	1465,09 ± 626,24 ^b	2523,45 ± 0,00 ^b
Parâmetros	55 dias				
	Controle	Gengibre		Manjeriço	
	0%	0,5%	1,0%	1,5%	1,0%
Glicose plasmática (mg.dL ⁻¹) ^{NS}	99,00 ± 4,14	101,00 ± 2,00	100,33 ± 3,76	102,50 ± 2,40	104,00 ± 2,65
Proteína sérica total (mg.mL ⁻¹) ^{NS}	51,19 ± 17,64	51,78 ± 10,23	42,79 ± 6,46	42,41 ± 1,79	43,14 ± 4,37
Imunoglobulinas (mg.mL ⁻¹) ^{NS}	33,44 ± 12,32	32,86 ± 10,28	29,94 ± 5,90	26,67 ± 1,67	26,23 ± 2,18
Colesterol total (mg.dL ⁻¹) [*]	297,5 ± 24,96 ^a	110,67 ± 10,67 ^b	101,67 ± 6,01 ^b	105,00 ± 6,45 ^b	104,67 ± 10,67 ^b
Triglicédeos (mg.dL ⁻¹) [*]	88,50 ± 4,80 ^a	49 ± 2,65 ^b	43,67 ± 4,73 ^b	49,00 ± 6,22 ^b	49,33 ± 4,51 ^b
Atividade da lisozima (U.mL ⁻¹) ^{NS}	1750,77 ± 983,51	1578,50 ± 523,40	1443,01 ± 440,85	1874,14 ± 0,00	1154,73 ± 0,00
			1357,88 ± 665,02		1831,72 ± 1268,39
					97,50 ± 4,43
					52,33 ± 10,16
					33,74 ± 6,51
					128,25 ± 41,19 ^b
					49,00 ± 5,03 ^b
					1848,17 ± 393,48 ^b
					97,00 ± 2,38
					44,17 ± 5,39
					28,35 ± 3,43
					109,50 ± 13,79 ^b
					52,00 ± 7,75 ^b

Tabela 2 – Número de centros de melanomacrófagos e área total do baço ocupada por centros em tilápias-do-nilo tratadas com óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre durante 55 dias. Letras distintas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Dunn, com nível de significância de 5%.

Tratamentos	Número de centros *	Área (%) ^{NS}
Controle	2,55 ± 1,63 ^a	0,95 ± 0,61
Gengibre 0,5%	2,41 ± 0,87 ^a	1,80 ± 1,67
Gengibre 1,0%	2,30 ± 1,99 ^a	2,42 ± 2,64
Gengibre 1,5%	2,02 ± 1,54 ^a	1,88 ± 2,65
Manjeriço 0,5%	0,19 ± 0,18 ^b	0,12 ± 0,13
Manjeriço 1,0%	2,52 ± 2,98 ^a	1,16 ± 0,80
Manjeriço 1,5%	2,38 ± 0,63 ^a	3,10 ± 3,31

Em teleósteos superiores, os macrófagos, células com alta capacidade fagocitária, podem se organizar em centros, que ocorrem principalmente em tecidos hematopoiéticos. Mudanças na formação de centros de melanomacrófagos são consideradas importantes marcadores de toxicidade e estresse [50]. Com relação à análise do tecido do baço, aos 55 dias de suplementação os peixes tratados com manjeriço a 0,5% mostraram aumento no número de centros de melanomacrófagos, porém, sem diferença significativa na área do baço ocupada por eles. Pode-se dizer que nestes animais os centros de melanomacrófagos apresentaram-se mais distribuídos, porém, sem alteração de intensidade nesta resposta. Tilápias-do-nilo tratadas com própolis (2%) na dieta durante 15 dias mostraram aumento nos centros de melanomacrófagos, porém, sete dias após, não havia diferença entre os tratamentos, indicando adaptação fisiológica à suplementação [19]. Considerando que o presente resultado foi obtido após 55 dias de suplementação, é possível que também tenha havido adaptação à dieta suplementada.

5. Conclusões

Os óleos essenciais na dieta de tilápias-do-nilo interferem positivamente no metabolismo de lipídios, reduzindo a concentração sérica de colesterol e de triglicerídeos. Por outro lado, os indicadores imunológicos (proteína sérica, imunoglobulinas, atividade da lisozima e centros de melanomacrófagos) não mostram alterações expressivas com

a suplementação, o que também representa benefício, pois não há estimulação excessiva de mecanismos de defesa que consomem energia e devem ser ativados somente diante de patógenos.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (MP2-01/2012) pelo auxílio financeiro, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado a A. Brum, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e bolsa a M. L. Martins (CNPq 305869/2014-0), à Nicoluzzi Rações (Penha-SC) pela ração utilizada no experimento, ao Dr. Eduardo Cargnin Ferreira (Instituto Federal de Santa Catarina - IFSC), Dra. Gabriela Tomas Jerônimo (Universidade Niltons Lins), Dr. Felipe do Nascimento Vieira (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC), Dr. André Luis Ferreira Lima (UFSC) e Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque (UFSC) pela revisão crítica do manuscrito.

7. Referências

- [1] FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture. <<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>>, 2014 (acesso 13.05.2017).
- [2] MSD Animal Health, Technical Bulletin: *Streptococcus* in the Tilapia Environment. <http://aqua.merck-animal-health.com/binaries/AquaVac_StreSa_tech01_0Nov12_050STREP_tcm56-35564.pdf>, 2012 (accessed 31.04.2017).
- [3] M. Lara-Flores, M.A. Olvera-Novoa, B.E. Guzmán-Mendez, W. López-Madrid, Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), Aquaculture 216 (1-4) (2003) 193-201.
- [4] E. Awad, A. Awaad, Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish, Fish Shellfish Immunol. 67 (2017) 40-54.
- [5] P. Kotzekidou, P. Giannakids, A. Boulamatsis, Antimicrobial activity of some plants extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate, Food Sci. Technol. 41 (2007) 119-127.

- [6] L. O. Orafidiya, E.O. Agbani, E.O. Iwalema, K.A. Adelusola, O.O. Oyedapo, Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf, *Phytomedicine* 11 (2004) 71-76.
- [7] M.A. Haniffa, K. Kavitha, Antibacterial activity of medicinal herbs against the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*, *J. Agric. Technol.* 8 (1) (2012) 205-211.
- [8] L.D.L. Silva, T.V. Parodi, P. Reckziegel, V.D.O. Garcia, M.E. Bürger, B. Baldisserotto, C.A. Malmann, A.M.S. Pereira, B.R. Heinzmann, Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*, *Aquaculture* 350 (2012) 91-97.
- [9] M. Kone, M. Cisse, K. Afformou, R.E. Soric, A. Fantodji, D.L. Miron, In vivo antiparasitic effects of an African's traditional plant *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1758) on fish louse *Argulus* spp. infesting the Nile tilapia males *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in fish farming, *Open Sci. Reposi. Vet. Med. (Online)*. doi: 10.7392/openaccess.23050447, 2013.
- [10] A. Brum, S.A. Pereira, M.S. Owatari, E.C. Chagas, F.C.M. Chaves, J.L.P. Mouriño, M.L. Martins, Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*, *Aquaculture* 468 (2017) 235-243.
- [11] B.H. Ali, G. Blunden, M.O. Tanira, A. Nemmar, Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 409-420.
- [12] S.K. Dugenci, N. Arda, A. Candan, Some medicinal plants as immunostimulant for fish, *J. Ethnopharmacol.* 88 (2003) 99-106.
- [13] H.G. Kanani, Z. Nobahar, S. Kakoolaki, H. Jafarian, Effect of ginger and garlic supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*, *Fish Physiol. Biochem.* 40 (2014) 481-490.
- [14] E.J. Nya, B. Austin, Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila*

infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, J. Fish Dis. 32 (2009) 971-977.

[15] A.D. Talpur, M. Ikhwanuddin, A.M.A. Bolong, Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*, Aquaculture 400 (2013) 46-52.

[16] Ü. Acar, O.S. Kesbiç, S. Yilmaz, N. Gültepe, A. Türker, Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*, Aquaculture (2015) 437, 282-286.

[17] B. Magnadóttir, Innate immunity of fish (overview), Fish Shellfish Immunol. 20 (2) (2006) 137-151.

[18] A.A. Hadi, A.E. Shokr, S.F. Alwan, Effects of aluminum on the biochemical parameters of fresh water fish, *Tilapia zillii*, Benghazi Univ. Press 3(1) (2009) 33-41.

[19] J. Ledic-Neto, G. Dotta, P. Garcia, A. Brum, E.L.T. Gonçalves, M.L. Martins, Haematology and melanomacrophage centers of Nile tilapia fed supplemented diet with propolis, Acta Sci. Biol. Sci. 36 (3) (2014) 263-269.

[20] A. Antache, V. Cristea, I. Grecu, L. Dediu, M. Cretu, S.M. Petrea, The influence of some probiotics on haematological and some biochemical indexes at *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol. 47 (1) (2014), 192-199.

[21] V. Sivaram, M.M. Babu, G. Immanuel, S. Murugadass, T. Citarasu, M.P. Marian, Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections, Aquaculture 237 (2004) 9-20.

[22] A.E. Ellis, Lysozyme assays, in: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson, W.B. Van Muiswinkel, 1990, pp. 101-103.

[23] E.R. Weibel, Principles and methods for morphometrical study of the lung and other organs, Lab. Inv. 12 (1963) 131-155.

- [24] P. Garcia, A.R.M. Magalhães, Protocolo de identificação e quantificação de bucefalose (enfermidade laranja) em mexilhões *Perna perna*, Bol. Inst. Pesca 34 (2008) 11-19.
- [25] E. Zaniboni Filho, Piscicultura das espécies nativas de água doce, in: C.R. Poli, A.T.B. Poli, E. Andreatta, E. Beltrame (Eds.), Aquicultura: Experiências brasileiras. Multitarefa, Florianópolis, 2004, pp. 337- 368.
- [26] E. Baba, Ü. Acar, C. Öntaş, O.S. Kesbiç, S. Yilmaz, Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*, Aquaculture 465 (2016) 13-18.
- [27] G.S.O. Hashimoto, F. Marinho Neto, M.L. Ruiz, M. Acchile, E.C. Chagas, F.C.M. Chaves, M.L. Martins, Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia, Aquaculture 450 (2016) 182-186.
- [28] R. Coz-Rakovac, I. Strunjak-Perovic, M. Hacmanjek, N. Topic-Popovic, Z. Lipej, B. Sostaric, Blood chemistry and histological properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea, Vet. Res. Commun. 29 (2005) 677-687
- [29] R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, The metabolic syndrome, Lancet 365 (2005) 1415–1428.
- [30] T. Wagner, J.L. Congleton, Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), Can. J. Fish. Aquat. Sci. 61 (7) (2004) 1066-1074.
- [31] J. M. Dietschy, S. D. Turley, Control of cholesterol turnover in the mouse. J. Biol. Chem. 277 (2002) 3801-3804.
- [32] D. R. Tocher, Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Rev. Fish. Sci. 11(2) (2003) 107-184.
- [33] P. J. Babin, P. M. Vernier, Plasma lipoproteins in fish. J. Lipid Res. 30 (1989) 467-489.

- [34] T. Y. Chen, B. C. Lin, M. S. Shiao, B.S. Pan, Lipid lowering and LDL-oxidation inhibitory effects of aqueous extract of freshwater clam (*Corbicula fluminea*) using tilapia as an animal model, *J. Food Sci.* 73 (2008) 148-154.
- [35] S. W. Zhai, J. J. Lu, X. H. Chen. Effects of dietary grape seed proanthocyanidins on growth performance, some serum biochemical parameters and body composition of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Ital. J. Anim. Sci* 13 (2016) 535-540.
- [36] F.O. Agoreyo, B. O. Agoreyo, M. N. Onuorah, Effect of aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa* and *Zingiber officinale* on blood cholesterol and glucose levels of rats. *Afr. J. Biotechnol.* 7(21) (2008) 3949-3951.
- [37] P.Y. Chao, J.A. Lin, W.J. Ting, H. H. Lee, K. Hsieh, Y. W. Chiu, T. J. Lai, J. M. Hwang, J. Y. Liu, C. Y. Huang. *Int. J. Med. Sci.* 13 (2016) 819-824.
- [38] G. Immanuel, R.P. Uma, P. Iyapparaj, T. Citarasu, S.M. Punitha, M.M. Babu, A. Palavesam, Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus*, *J. Fish Biol.* 74 (2009) 1462-1475.
- [39] K.H. Cho, 1,8-cineole protected human lipoproteins from modification by oxidation and glycation and exhibited serum lipid-lowering and anti-inflammatory activity in zebrafish, *BMB Reports* 45 (10) (2012) 565-570.
- [40] M. Najafian, A. Ebrahim-Habibi, P. Yaghmaei, K. Parimar, B. Larijani, Citral as a potential antihyperlipidemic medicine in diabetes: a study on streptozotocin-induced diabetic rats, *J. Diabetes Metab. Disord.* 10 (2011) 1-8.
- [41] M.B. Al-Salahy, Some physiological studies on the effect of onion and garlic juices on the fish, *Clarias lazera*, *Fish Physiol. Biochem.* 27 (2002) 129-142.
- [42] T.C. Hrubec, J.L. Cardinale, S.A. Smith, Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*), *Vet. Clin. Pathol.* 29 (1) (2000) 7-12.

- [43] C.Y. Chen, G.A. Wooster, R.G. Getchell, P.R. Bowser, M.B. Timmons, Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis, *Aquaculture* 218 (2003) 89-102.
- [44] M.J. Mael, D.L. Miller, A.L. Merrill, Hematologic and plasma biochemical values of health hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis nilotica*) maintained in a recirculating system, *J. Zoo Wildl. Med.* 38 (2007), 420-424.
- [45] A.H. Mastoi, M. Sukumaran, A. Mastoi, A. Hussan, F. Shaharom, A. Chatterji,, Differences in haematological parameters in normal, infected and immune-primed fingerlings of red tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*), *Biol. Forum* 4 (1) (2012) 90-97.
- [46] D.C. Melo, D.A.A. Oliveira, M.M. Melo, D.V. Junior, E.A. Teixeira, S.R. Guimarães, Proteic electrophoretic profile of chitralada tilapia nilotic (*Oreochromis niloticus*), exposed to hypoxia chronic stress, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(5) (2009) 1183-1190.
- [47] L. Ardó, G. Yin, P. Xu, L. Váradi, G. Szigeti, Z. Jeney, G. Jeney, Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*, *Aquaculture* 36 (3) (2008) 26-33.
- [48] G. Dotta, J.I.A. Andrade, E.L.T. Gonçalves, A. Brum, J.J. Mattos, M. Maraschin, M.L. Martins, Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and *Aloe barbadensis*, *Fish Shellfish Immunol.* 39 (2014) 280-284.
- [49] L. Tort, J.C. Balasch, S. Mackenzie, Fish immune system. A crossroads between innate and adaptative responses, *Inmunología* 22 (2003) 277-286.
- [50] S. Balamurugan, B. Deivasigamani, S. Kumaran, M. Sakthivel, T. Rajsekar, P. Priyadharsini, Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bioindicator of environmental change, *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2 (2) (2012) 635-638.

CAPÍTULO III

Alterações histológicas em tilápias-do-nilo após suplementação dietária com óleos essenciais de manjeriço e gengibre e desafio com *Streptococcus agalactiae*

Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*

Aline Brum ^a, Lucas Cardoso ^a, Edsandra Campos Chagas ^b, Francisco Célio Maia Chaves ^b, José Luiz Pedreira Mouriño ^a, Maurício Laterça Martins ^a

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

^b EMBRAPA Amazônia Ocidental, Rod. AM 010, km 29, Zona Rural, 69010-970 Manaus, AM, Brasil.

* Autor correspondente: A. Brum. Laboratório AQUOS- Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

Artigo redigido conforme as normas do periódico “Aquaculture” (ISSN 0004-8486)

Resumo

A suplementação dietária com produtos naturais é uma alternativa promissora para incrementar a capacidade imunológica e resistência a infecções em peixes cultivados. Porém, são escassas as informações sobre efeito destes aditivos na morfologia e na funcionalidade dos órgãos de peixes. O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da suplementação dietária com óleos essenciais de manjeriço-cravo (*Ocimum gratissimum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) sobre a morfologia intestinal e alterações histológicas em órgãos internos de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Juvenis ($1,84 \pm 0,52$ g) alimentados por 55 dias com dietas suplementadas (0,5%, 1,0% e 1,5%) foram desafiados via gavagem com *S. agalactiae*. Aos 55 dias de suplementação e 10 dias após a infecção, foram coletadas amostras de intestino, fígado, baço, coração e brânquias. Após processamento, os tecidos foram cortados (3-5 μ m) e corados com hematoxilina de Harris e eosina para análise. Aos 55 dias de suplementação, os peixes alimentados com manjeriço a 1,5% mostraram menor grau de picnose nos hepatócitos, enquanto este óleo a 1,0% reduziu a esteatose no ventrículo. Nas brânquias, os peixes tratados com manjeriço a 0,5% e 1,0% e gengibre a 0,5% apresentaram redução no grau de descolamento do epitélio das lamelas secundárias, enquanto os tratados com gengibre a 1,0% e 1,5% mostraram redução na hiperplasia interlamelar. Dez dias após a infecção, o grau de congestão hepática foi reduzido nos peixes alimentados com manjeriço a 1,5%, bem como a microesteatose hepática nos tratados com gengibre a 0,5% e manjeriço a 0,5%. A suplementação com manjeriço a 1,5% também reduziu o grau de necrose hepática. A microesteatose cardíaca mostrou redução nos peixes alimentados com manjeriço a 0,5% e infectados. Nas brânquias, a congestão mostrou-se amenizada nos peixes alimentados com manjeriço a 1,0% e 1,5%. Quando adicionados à dieta em doses moderadas, os óleos essenciais não causaram prejuízo aos órgãos analisados e mostraram-se úteis para amenizar danos teciduais, inclusive em situações de infecção.

Palavras-chave: *Ocimum gratissimum*, *Zingiber officinale*, fígado, coração, brânquias, morfologia intestinal.

Abstract

Dietary supplementation with natural products is a promising alternative for increasing immunological capacity and disease resistance in farmed fish. However, information about the effects of these additives on morphology and functionality of fish organs are scarce. The aim of this study was to verify the effects of dietary supplementation with essential oils of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) on gut morphology and histological alterations in internal organs of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Juveniles (1.84 ± 0.52 g) were fed for 55 days with supplemented diets (0.5, 1.0% and 1.5%) and challenged via gavage with *S. agalactiae*. At 55 days of supplementations and ten days after challenge, samples of intestine, liver, spleen, heart and gills were collected. After processing, the tissue sections (3-5 μm) were made and stained with Harris' hematoxylin and eosin for analysis. At 55 days of supplementation, fish fed basil at 1.5% showed reduced pyknosis in hepatocytes and this oil also reduced steatosis in ventricle. In the gills, fish fed basil at 0.5% and 1.0% and ginger at 0.5% showed reduced degree of epithelial detachment in the secondary lamellae while fish fed ginger at 1.0% and 1.5% showed reduced interlamellar hyperplasia. Ten days after infection, the degree of hepatic congestion was reduced in fish fed basil at 1.5%, as well as hepatic steatosis in those supplemented with ginger at 0.5% and basil at 0.5%. Basil supplementation at 1.5% was responsible for reduced degree of hepatic necrosis. Steatosis in heart tissue was reduced in fish fed basil at 0.5% and infected. In the gills, congestion was attenuated in fish fed basil at 1.0% and 1.5%. When added to the diet in moderated doses, the essential oils did not cause harm to the organs, being useful to ameliorate tissue damages, even in situations of infection.

Keywords: *Ocimum gratissimum*, *Zingiber officinale*, liver, heart, gills, gut morphology.

Destaques

- Óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre foram avaliados como suplementos na dieta de tilápias-do-nylo durante 55 dias;
- Ambos os óleos amenizaram danos teciduais no fígado, coração e brânquias;
- A suplementação favoreceu a morfologia intestinal em peixes infectados.

1.Introdução

A tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de água doce mais cultivada e comercializado no mundo, constituindo importante fonte de proteína para a nutrição humana. No ano de 2015, a produção mundial de tilápia-do-nylo foi correspondente a cerca de seis bilhões de dólares (FAO, 2017). Porém, uma parcela considerável da produção é perdida devido a enfermidades, representando vasto prejuízo econômico. Entre as enfermidades que causam perdas na tilapicultura, a infecção por *Streptococcus agalactiae* provoca mortalidades massivas em diversos países, sendo uma infecção de rápido progresso e com potencial zoonótico (Evans et al., 2009, MSD Animal Health, 2012).

Vacinas comerciais eficazes contra a estreptococose estão disponíveis no mercado, porém existem limitações para a vacinação de peixes em estágios iniciais de vida, além da susceptibilidade a diversos outros patógenos (Absali e Mohamad, 2010, MSD Animal Health, 2012). A suplementação dietária com produtos naturais que auxiliem na resposta imune representa alternativa segura para prevenir infecções, podendo ser aplicada em momentos críticos da produção, como a larvicultura (Bricknell e Dalmo, 2005). Nos últimos anos, diversos estudos vêm confirmando a eficácia de produtos de origem vegetal na prevenção de enfermidades em peixes cultivados (Awad e Awaad, 2017).

Entre as plantas investigadas no presente estudo, o manjeriço-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) já demonstrou atividade antimicrobiana contra bactérias que causam enfermidades em peixes (Haniffa e Kavitha, 2012) e atividade antiparasitária por banho de imersão em tilápia-do-nylo (*O. niloticus*) infestada por *Argulus* sp. (Crustacea) (Kone et al., 2013). O óleo essencial de *O. gratissimum* mostrou-se um anestésico eficaz e seguro para jundiá (*Rhamdia quelen*) (Silva et al.,

2012), além de promover maior ganho de peso e atividade fagocitária em tilápias-do-nilo (Brum et al., 2017).

O gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) é uma planta cujo rizoma apresenta compostos imunoestimulantes, antimicrobianos e antiparasitários (Ali et al., 2008). Em peixes, a suplementação dietária com gengibre em pó mostrou-se útil para incrementar a capacidade imunológica (Düğenci et al., 2003, Nya e Austin, 2009, Talpur et al., 2013, Hassanin et al., 2014) e resistência a infecções (Nya e Austin, 2009, Talpur et al., 2013, Hassanin et al., 2014), além de proporcionar melhoria no desempenho zootécnico (Punitha et al., 2008). O óleo essencial de gengibre adicionado à dieta mostrou-se útil para incrementar a resposta imunológica em tilápias-do-nilo (*O. niloticus*) (Brum et al., 2017).

Contudo, ao fazer uso de aditivos na dieta, é importante certificar-se que eles não causam toxicidade ao animal tratado. Neste sentido, a histologia é uma ferramenta útil, pois as características teciduais de órgãos internos podem expressar eventuais efeitos tóxicos de substâncias aos quais o animal esteja exposto (Schwaiger et al., 1997). Os óleos essenciais vêm se apresentando como alternativa eficaz para prevenção de enfermidades em peixes, porém, são escassos os conhecimentos sobre o efeito da suplementação dietária com estes produtos sobre as características histológicas de órgãos internos em peixes.

O objetivo deste estudo foi verificar a influência da suplementação dietária com óleos essenciais de manjeriço-cravo e de gengibre sobre a morfologia intestinal e alterações histológicas em órgãos internos em tilápias-do-nilo desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

2. Material e métodos

2.1. Peixes e condições experimentais

Um total de 1080 juvenis de tilápia-do-nilo pertencentes à linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), com comprimento total de $3,92 \pm 0,36$ cm e peso de $1,84 \pm 0,52$ g, foi obtido junto a uma piscicultura comercial no município de Paulo Lopes, Santa Catarina, Brasil. Os peixes passaram por exame macroscópico para verificar a presença de eventuais injúrias causadas por parasitos ou outros patógenos. Dez peixes foram anestesiados com eugenol (75 mg L^{-1}) e eutanasiados por comoção cerebral (CEUA/UFSC PP008696)

para análise parasitológica do muco, brânquias e órgãos internos, bem como para verificação de qualquer sinal clínico de enfermidade. Os peixes examinados não apresentaram parasitos nem sinais de infecção. Após a biometria, os peixes foram aleatoriamente distribuídos em 24 tanques circulares de fibra (100 L cada), totalizando 45 peixes por tanque. Os tanques eram conectados a um sistema de recirculação contendo filtragem mecânica, biológica e ultravioleta. Havia aeração constante, aquecedor central com termostato regulado a 26 °C e fotoperíodo controlado (12 h). Os tratamentos foram iniciados após três dias de aclimação.

Durante o período de aclimação, os peixes foram alimentados até saciedade aparente com ração comercial contendo 40% de proteína bruta (Nicoluzzi®, Brasil). Após a aclimação, os peixes foram alimentados por 55 dias com as dietas experimentais a seguir: controle (quatro réplicas), óleo essencial de manjeriço-cravo a 0,5% (três réplicas), 1,0% (três réplicas) e 1,5% (três réplicas) e óleo essencial de gengibre a 0,5% (três réplicas), 1,0% (três réplicas) e 1,5% (quatro réplicas), totalizando sete tratamentos em 24 unidades experimentais. A escolha das concentrações baseou-se nos resultados de Antache et al. (2014), Nya e Austin (2009) e Talpur et al. (2013), que utilizaram gengibre seco em pó e Sivaram et al. (2004), que acrescentaram extrato metanólico de manjeriço-santo (*Ocimum sanctum*) em dietas para peixes.

Os parâmetros de qualidade de água foram verificados diariamente, pela manhã e ao final da tarde. Temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, pH, salinidade, condutividade elétrica e total de sólidos em suspensão foram medidos com equipamento multiparâmetro HI-9829 (Hanna Instruments, Padova, Itália). As concentrações de amônia total, nitrito, nitrato e alcalinidade foram medidas com kits colorimétricos (Alfakit, Florianópolis, Brasil).

Ao longo do experimento os valores de temperatura foram $26,70 \pm 1,17$ °C, oxigênio dissolvido $6,36 \pm 0,47$ mg L⁻¹, pH $7,53 \pm 0,31$, condutividade elétrica $592,70 \pm 184,97$ µS cm⁻¹, salinidade $0,28 \pm 0,10$ ‰, amônia total $0,85 \pm 0,65$ mg L⁻¹, nitrito $0,14 \pm 0,14$ mg L⁻¹, nitrato $0,00 \pm 0,00$ mg L⁻¹, alcalinidade $54,08 \pm 30,69$ mg CaCO₃ L⁻¹ e sólidos em suspensão $285,93 \pm 92,27$ mg L⁻¹.

2.2.Extração e composição dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos e analisados nas mesmas condições apresentadas por Brum et al. (2017) e sua composição é mostrada na Figura 1.

2.3.Preparo das dietas,rotina de alimentação e desafio com *S. agalactiae*

A metodologia de inclusão dos óleos na dieta, a rotina de alimentação e os procedimentos de desafio com *Streptococcus agalactiae*, bem como o reisolamento da bactéria após a infecção, foram previamente descritos por Brum et al. (2017).

2.4.Análises histológicas

Aos 55 dias de suplementação e dez dias após a infecção, três peixes de cada tanque (nove por tratamento) foram anestesiados em solução de eugenol (75 mg L⁻¹) e eutanasiados por comoção cerebral (CEUA/UFSC PP008696) para coleta de amostras destinadas à histologia. Fragmentos de fígado, baço, coração e brânquias, bem como o terço anterior do intestino, foram fixados em formalina tamponada 10%. Os órgãos foram desidratados em série crescente de álcool etílico, clarificados em xilol e incluídos em parafina a 60°C. Cortes de 3 a 5 µm de espessura (micrótomo PAT- MR10) foram corados com hematoxilina de Harris e eosina (HHE). Posteriormente à coloração, as lâminas foram montadas em meio Entellan® e analisadas em microscópio de contraste de interferência de fase (DIC) Axio Imager A.2 (Zeiss, Gottingen, Alemanha).

Em relação à morfologia intestinal, foram medidos o comprimento, largura e o perímetro dos vilos, além de quantificação dos vilos e células calciformes, com o software Zen Pro. Para todos os órgãos, atribuiu-se valores às alterações histológicas, conforme o grau de intensidade: 0 (ausência de alteração), 1 (alteração leve, correspondendo a menos de 25% da área do órgão), 2 (alteração moderada, 25% a 50% da área do órgão) e 3 (alteração severa, mais de 50% da área do órgão), de acordo com o método descrito por Schwaiger et al. (1997) ligeiramente modificado

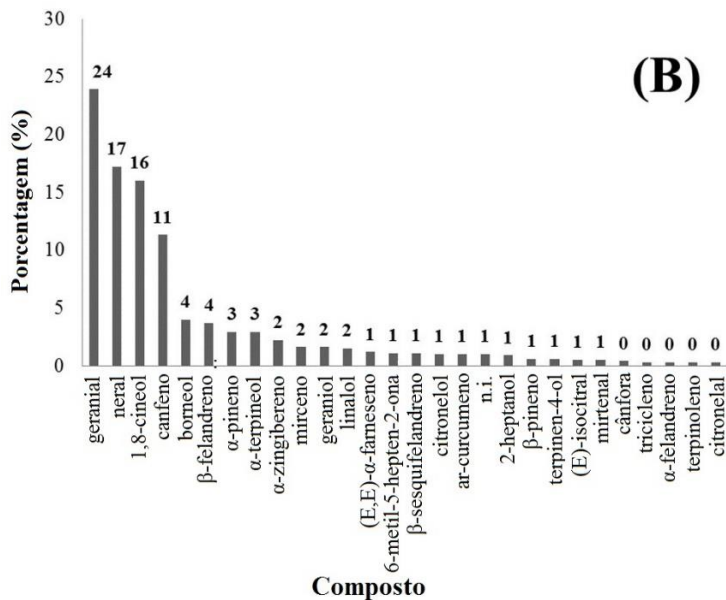
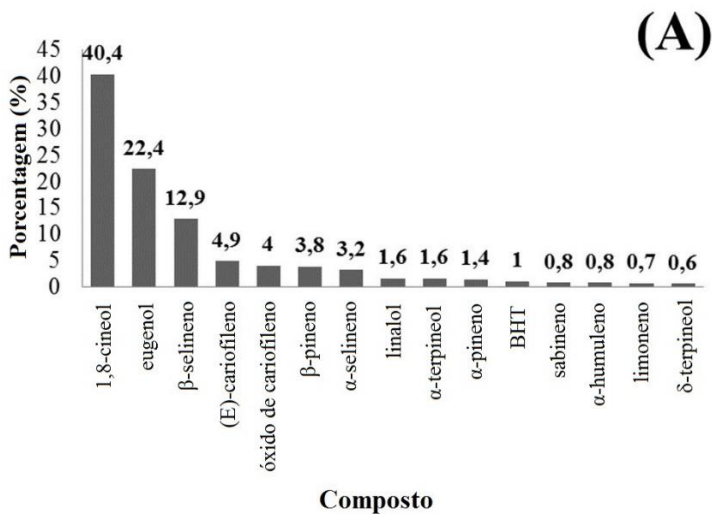


Fig. 1: Composição dos óleos essenciais. A. Manjeriçao-cravo (*Ocimum gratissimum*) B. Gengibre (*Zingiber officinale*). n.i. = compostos não identificados.

No tecido branquial foram consideradas as seguintes alterações: aneurisma, congestão e dilatação do veio central, congestão na base da lamela secundária, descolamento do epitélio da lamela secundária, dilatação do seio venoso, edema justalamelar, fusão de lamelas secundárias, hiperplasia interlamelar, hiperplasia da lamela secundária, infiltrado eosinofílico, infiltrado linfocitário e telangiectasia. No fígado, considerou-se como alterações o aspecto balonoso dos hepatócitos, congestão nos grandes vasos, nos sinusoides e no pâncreas, dilatação dos sinusoides, hipertrofia dos hepatócitos, infiltrado eosinofílico e linfocitário, perda do aspecto cordonal dos sinusoides, perda da estrutura do pâncreas, macroesteatose, microesteatose, necrose e núcleos picnóticos. No coração avaliou-se congestão, infiltrado eosinofílico e linfocitário, microesteatose e necrose. No baço, considerou-se congestão, infiltrado eosinofílico e linfocitário e necrose, e no intestino, infiltrado eosinofílico e linfocitário e necrose.

2.5.Reisolamento da bactéria

Na coleta pós-desafio, fragmentos de fígado, rim e cérebro foram coletados assepticamente para reisolamento da bactéria. As amostras foram colocadas em tubos contendo meio líquido BHI (HiMedia, Mumbai, Índia) para crescimento. Posteriormente, o conteúdo foi plaqueado em meio ágar triptona de soja (HiMedia) enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e as placas foram incubadas a 28 °C por 12 h para visualização e caracterização das colônias de *S. agalactiae*.

2.6.Análises estatísticas

A comparação dos dados de intensidade das lesões histológicas foi feita por teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para comparação de médias. Os dados histomorfométricos do intestino foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para comparação de médias. Transformações de dados foram aplicadas quando necessárias. Para todos os testes utilizou-se o software *Statistica 13.0* (Statsoft Inc., Tulsa, EUA) e considerou-se nível de significância de 5%.

3.Resultados

3.1.Morfometria intestinal

Aos 55 dias de suplementação, não houve diferença significativa nos parâmetros morfométricos do intestino (Tabela 1). Porém, dez dias após a infecção, observou-se que a altura dos vilos foi significativamente maior nos peixes tratados com óleo essencial de gengibre (0,5%, 1,0% e 1,5%) e manjeriço a 1,5%, em comparação com o controle. Quanto à largura dos vilos, peixes alimentados com gengibre a 1,0% apresentaram valores significativamente mais altos, enquanto os demais não diferiram do controle. Quanto ao perímetro total da superfície dos vilos, os peixes que receberam dieta contendo gengibre a 1,0% mostraram valores maiores do que os tratados com manjeriço a 1,0%, porém, todos foram similares ao controle. O número de células caliciformes nos vilos intestinais foi significativamente mais alto nos peixes alimentados com gengibre a 1,0% e manjeriço a 0,5% e 1,5%, em comparação com o controle. Os demais parâmetros não mostraram diferença significativa entre os tratamentos.

3.2.Alterações histológicas

No intestino (Tabela 2), aos 55 dias de suplementação, registrou-se diferença significativa no infiltrado linfocitário, que se mostrou mais intenso nos peixes tratados com gengibre a 1,5%, enquanto os demais não diferiram do controle. Após a infecção, houve infiltrado eosinofílico mais intenso ($p < 0,05$) nos peixes tratados com gengibre 1,0% em comparação com 1,5%, porém, sem diferenças em relação ao controle.

O infiltrado linfocitário mostrou maior intensidade no intestino dos peixes tratados com gengibre a 0,5% em comparação com os tratados com manjeriço (0,5%, 1,0% e 1,5%), porém, nenhum tratamento diferiu do controle. Não houve diferença significativa na intensidade da necrose nos vilos.

No fígado (Tabela 3), aos 55 dias de suplementação, os peixes alimentados com manjeriço a 1,0% apresentaram mais congestão nos sinusoides em comparação com os que receberam manjeriço a 1,5%, porém, nenhum tratamento diferiu do controle. A intensidade da picnose nos núcleos dos hepatócitos foi significativamente mais baixa nos peixes tratados com manjeriço a 1,5% do que no controle. Dez dias após a infecção, a intensidade de congestão no pâncreas foi significativamente mais alta nos peixes alimentados com gengibre a 1,5% em comparação

com os peixes controle, manjeriçã 0,5% e 1,0%. Os peixes cuja dieta foi suplementada com a manjeriçã 1,5% apresentaram menor congestã nos sinusoides em comparaçã com o controle (Figura 3A-B). Quanto à dilataçã dos sinusoides, os peixes tratados com manjeriçã a 1,0% mostraram maior intensidade do que com manjeriçã a 1,5%, porém, todos os animais alimentados com raçã suplementada foram similares aos do controle. A macroesteatose foi mais frequente nos peixes alimentados com manjeriçã a 1,5% do que nos alimentados com manjeriçã a 0,5% e 1,0% a gengibre a 1,5%, porém, sem diferir do controle. Os peixes tratados com gengibre a 0,5% e manjeriçã a 0,5% mostraram reduçã significativa da microesteatose hepática, enquanto a intensidade da necrose foi significativamente reduzida no tratamento com manjeriçã a 1,5%, em comparaçã com o controle (Fig. 3C-D).

As alteraçães histológicas no baço (Tabela 4) aos 55 dias de suplementaçã incluíram congestã, que foi mais alta nos animais tratados com gengibre (0,5%, 1,0% e 1,5%) e manjeriçã 0,5% do que nos tratados com manjeriçã 1,5%, porém, todos foram semelhantes ao controle. Após a infecçã houve, novamente, diferença significativa na congestã do baço, com intensidade mais alta nos peixes tratados com gengibre a 1,5% do que com manjeriçã a 1,0%, porém, sem diferença em relaçã ao controle. A presença de infiltrado linfocitário no baço foi mais intensa nos peixes alimentados com manjeriçã a 1,5% do que com manjeriçã a 0,5% e gengibre a 1,0% e 1,5%, sem diferença em comparaçã com o controle.

Tabela 1 – Morfometria intestinal de tilápia-do-nilo suplementada com óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre por 55 dias e 10 dias após desafio com *Streptococcus agalactiae*. Letras distintas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Parâmetros	55 dias de suplementação						
	Gengibre			Manjeriço			
	Controle	0,5%	1,0%	1,5%	1,0%		
Nº de vilos ^{NS}	32,25 ± 8,51	29,67 ± 6,12	36,00 ± 5,35	35,11 ± 7,94	25,14 ± 7,99	28,29 ± 8,98	32,86 ± 5,27
Altura dos vilos (µm) ^{NS}	270,48 ± 84,25	295,98 ± 66,36	287,38 ± 76,81	248,65 ± 57,25	236,43 ± 74,77	227,68 ± 62,30	288,84 ± 64,88
Largura dos vilos (µm) ^{NS}	95,25 ± 38,08	95,81 ± 22,69	92,85 ± 25,06	87,36 ± 32,07	97,38 ± 30,03	87,69 ± 25,78	101,92 ± 27,15
Perímetro individual (µm) ^{NS}	608,18 ± 114,64	725 ± 454	561,55 ± 124,55	542,49 ± 93,99	550,82 ± 143,50	494 ± 31 ± 107,92	672,72 ± 190,65
Perímetro total (µm) ^{NS}	19942 ± 7370	20318 ± 9350	20511 ± 6405	19274 ± 5105	13789 ± 5755	14396 ± 6154	21883 ± 5731
Nº de células caliciformes ^{NS}	4,64 ± 2,29	7,93 ± 4,13	6,88 ± 4,13	5,58 ± 3,75	10,32 ± 8,88	8,17 ± 5,44	6,09 ± 4,09
Parâmetros	10 dias pós-infecção						
	Gengibre			Manjeriço			
	Controle	0,5%	1,0%	1,5%	1,0%		
Nº de vilos ^{NS}	31,33 ± 8,07	38,50 ± 5,63	39,00 ± 6,50	34,00 ± 4,20	39,64 ± 7,15	44,00 ± 5,60	65,00 ± 20,00
Altura dos vilos (µm) ^{NS}	216,36 ± 62,59 ^d	250,44 ± 98,97 ^{bc}	240,01 ± 62,25 ^{bc}	250,55 ± 92,09 ^{ab}	231,41 ± 74,86 ^{cd}	208,91 ± 35,48 ^d	268,65 ± 85,47 ^a
Largura dos vilos (µm) [*]	79,38 ± 19,39 ^{bc}	85,13 ± 23,87 ^{ab}	86,96 ± 25,69 ^a	77,37 ± 29,75 ^c	83,80 ± 23,18 ^{ab}	70,86 ± 12,70 ^c	83,90 ± 25,97 ^{ab}
Perímetro individual (µm) ^{NS}	578,78 ± 202,83	524,41 ± 140,39	540,16 ± 79,75	491,90 ± 65,45	482,84 ± 76,28	379,32 ± 62,53	411,47 ± 250,53
Perímetro total (µm) [*]	17265 ± 3784 ^{ab}	20271 ± 5966 ^{ab}	20748 ± 2707 ^a	16763 ± 3556 ^b	18892 ± 3521 ^{ab}	16690 ± 2569 ^b	20143 ± 4631 ^{ab}
Nº de células caliciformes [*]	5,97 ± 3,34 ^c	6,77 ± 5,13 ^c	7,63 ± 4,49 ^b	6,18 ± 4,70 ^c	9,00 ± 5,41 ^a	7,05 ± 3,26 ^{bc}	7,71 ± 3,96 ^{ab}

Tabela 2 – Intensidade de alterações histológicas no intestino de tilápia-do-nilo suplementada com óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre, aos 55 dias de suplementação e 10 dias após desafio com *Streptococcus agalactiae*. Letras distintas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Dunn, com nível de significância de 5%.

55 dias de suplementação						
Alterações	Gengibre		Manjeriço		Manjeriço	
	Controle	0,5%	1,0%	1,5%	0,5%	1,5%
Infiltrado eosinofílico ^{NS}	0,89 ± 0,33	1,00 ± 1,00	0,83 ± 0,41	0,78 ± 0,67	0,57 ± 0,53	0,55 ± 0,52
Infiltrado linfocitário *	0,11 ± 0,33 ^{bc}	0,00 ± 0,00 ^{bc}	0,50 ± 0,84 ^{ab}	0,67 ± 0,71 ^a	0,00 ± 0,00 ^{bc}	0,29 ± 0,76 ^{bc}
Necrose dos vilos ^{NS}	2,33 ± 1,32	2,57 ± 0,53	2,00 ± 1,26	2,44 ± 1,01	1,71 ± 1,46	1,82 ± 1,33
10 dias pós-infecção						
Alterações	Gengibre		Manjeriço		Manjeriço	
	Controle	0,5%	1,0%	1,5%	0,5%	1,5%
Infiltrado eosinofílico *	0,67 ± 0,52 ^{ab}	0,63 ± 0,52 ^{ab}	1,00 ± 0,00 ^a	0,50 ± 0,55 ^b	0,91 ± 0,30 ^{ab}	1,00 ± 0,00 ^{ab}
Infiltrado linfocitário *	0,00 ± 0,00 ^{ab}	0,25 ± 0,46 ^a	0,13 ± 0,35 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
Necrose dos vilos ^{NS}	0,83 ± 0,98	1,38 ± 1,30	1,75 ± 1,28	2,17 ± 1,33	1,27 ± 1,35	3,00 ± 2,00

Quanto às lesões observadas no coração (Tabela 5), aos 55 dias de suplementação a congestão no bulbo foi mais intensa nos peixes tratados com manjeriço a 1,5% do que no controle, além dos tratados com manjeriço a 1,0%. Infiltrados linfocitários no tecido cardíaco foram observados com maior intensidade nos animais alimentados com gengibre a 1,0% e com manjeriço a 1,5% do que nos tratados com manjeriço a 1,0% e no controle. A ocorrência de microesteatose no ventrículo foi reduzida nos peixes tratados com manjeriço a 1,0%, em comparação com o controle (Figura 2 A-B). Dez dias após o desafio, registrou-se maior intensidade de congestão no átrio dos peixes alimentados com gengibre a 0,5% a 1,0% do que no controle. Todos os animais que receberam dieta suplementada mostraram redução significativa na presença de infiltrado eosinofílico, em comparação com o controle. A microesteatose no bulbo foi significativamente mais baixa nos peixes alimentados com manjeriço a 0,5% e similar ao controle nos demais peixes cuja dieta foi suplementada (Figura 3 E-F).

Dentre as alterações registradas no tecido branquial (Tabela 6), aos 55 dias de alimentação suplementada, os peixes tratados com manjeriço a 0,5% a 1,0% e com gengibre a 0,5% apresentaram redução significativa no descolamento do epitélio da lamela secundária, em comparação com o controle (Figura 2 C-D). A ocorrência de hiperplasia nas lamelas secundárias também se mostrou reduzida nos peixes tratados com gengibre a 1,0% e 1,5% (Figura 2 E-F). Em relação à telangiectasia, os peixes tratados com manjeriço a 1,0% mostraram valores mais altos do que os tratados com gengibre a 1,0% e manjeriço a 0,5%. Após a infecção, os peixes alimentados com manjeriço a 1,0% e 1,5% não apresentaram congestão na base das lamelas secundárias, diferindo significativamente dos controle (Figura 3 G-H). A ocorrência de fusão das lamelas secundárias foi menos intensa nos peixes alimentados com gengibre a 0,5% do que com gengibre a 1,0% e 1,5% e com manjeriço a 0,5% a 1,0%, porém, os animais que receberam dieta suplementada não diferiram do controle. As demais alterações observadas não apresentaram diferença significativa de intensidade entre os tratamentos.

4. Discussão

Análises das alterações histológicas são úteis no diagnóstico de enfermidades, proporcionando informações sobre o mecanismo de ação dos patógenos no organismo (Marcel et al., 2013). No presente estudo, os óleos essenciais proporcionaram diferentes alterações antes e após a infecção, indicando efeito sobre a capacidade do organismo de combater a infecção e os danos por ela causados.

A morfologia do intestino reflete o estado de saúde dos peixes, estando ligada à capacidade de assimilação de nutrientes e também nas funções imunológicas (Nicholson et al., 2012). No presente estudo, a altura dos vilos intestinais permaneceu inalterada aos 55 dias de suplementação. Em tilápia-do-nilo suplementada com óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e não desafiada, não se observou diferença aos 30 dias de suplementação, porém, aos 60 dias, houve aumento significativo na altura dos vilos (Valladão et al., 2017). No presente estudo, é possível que o tempo de suplementação de 55 dias não tenha sido longo o suficiente para alterar o comprimento dos vilos. Entretanto, dez dias após a infecção, peixes alimentados com gengibre (0,5%, 1,0% e 1,5%) e manjerição a 1,5% mostraram aumento significativo na altura dos vilos, indicando maior capacidade imunológica durante a infecção. A largura dos vilos comportou-se de forma similar à altura, sendo inalterada aos 55 dias de suplementação. Tilápias-do-nilo alimentadas durante 60 dias com óleos essenciais de hortelã-pimenta (*M. piperita*) e melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e não desafiadas também não apresentaram alteração na largura dos vilos (Valladão et al., 2017). Após o desafio, os peixes tratados com gengibre a 1,0% apresentaram aumento na largura dos vilos e este aumento na largura refletiu-se em ganho significativo no perímetro total da superfície dos vilos.

Tabela 3 – Intensidade de alterações histológicas no fígado de tilápia-do-nilo suplementada com óleos essenciais de manjeriço-
55 dias de suplementação

Alterações	Controle		Gengibre		Manjeriço		
	0,5%	1,0%	0,5%	1,5%	0,5%	1,5%	
Aspecto balonoso ^{NS}	0,58 ± 0,90	0,17 ± 0,41	0,00 ± 0,00	0,42 ± 0,90	0,22 ± 0,44	0,38 ± 0,74	0,45 ± 0,82
Congestão grandes vasos ^{NS}	1,50 ± 1,17	0,67 ± 0,82	1,00 ± 0,82	1,08 ± 1,08	1,33 ± 1,22	1,00 ± 1,31	1,36 ± 1,03
Congestão no pâncreas ^{NS}	1,33 ± 1,15	0,83 ± 1,17	1,43 ± 0,98	1,67 ± 0,98	1,33 ± 1,22	1,75 ± 1,04	1,45 ± 1,21
Congestão dos sinusoides [*]	1,83 ± 0,94 ^{ab}	1,33 ± 1,03 ^{ab}	2,00 ± 0,82 ^{ab}	1,83 ± 1,03 ^{ab}	1,33 ± 0,50 ^{ab}	2,13 ± 0,99 ^a	1,27 ± 1,01 ^b
Dilatação dos sinusoides ^{NS}	1,17 ± 0,83	1,00 ± 1,26	1,86 ± 0,90	1,75 ± 1,14	1,00 ± 0,71	1,88 ± 1,25	1,00 ± 1,00
Hipertrofia hepatócitos ^{NS}	1,00 ± 0,74	1,33 ± 1,03	1,43 ± 0,79	1,17 ± 1,11	1,00 ± 0,71	1,63 ± 0,92	1,45 ± 0,93
Infiltrado eosinofílico ^{NS}	0,58 ± 0,51	0,83 ± 0,41	0,86 ± 0,69	0,58 ± 0,90	0,56 ± 0,73	0,88 ± 0,83	0,55 ± 0,52
Infiltrado linfocitário ^{NS}	0,42 ± 0,51	0,17 ± 0,41	0,71 ± 0,76	0,50 ± 0,67	0,67 ± 0,50	0,50 ± 0,53	0,45 ± 0,52
Perda aspecto cordonal ^{NS}	0,80 ± 0,79	0,60 ± 0,89	0,71 ± 0,95	1,27 ± 1,49	1,22 ± 1,48	1,88 ± 1,13	1,70 ± 1,34
Perda estrutura pâncreas ^{NS}	0,25 ± 0,62	0,17 ± 0,41	0,14 ± 0,38	0,42 ± 0,51	0,56 ± 0,53	0,25 ± 0,46	0,36 ± 0,50
Macrosteatose ^{NS}	0,33 ± 0,89	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,29	0,11 ± 0,33	0,13 ± 0,35	0,09 ± 0,30
Microsteatose ^{NS}	0,17 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,35	0,00 ± 0,00
Necrose ^{NS}	0,83 ± 0,58	1,17 ± 0,98	0,86 ± 0,37	0,50 ± 0,67	0,56 ± 0,53	0,75 ± 0,89	0,73 ± 0,79
Picnose [*]	1,58 ± 1,16 ^{ab}	1,50 ± 1,38 ^{abc}	2,14 ± 0,90 ^{ab}	1,42 ± 0,79 ^{bc}	2,33 ± 0,71 ^a	1,38 ± 1,06 ^{bc}	0,73 ± 0,65 ^c

Tabela 3 – continuação.

Alterações	10 dias pós-infecção										
	Controle		0,5%		1,0%		1,5%		Manjerição		
									0,5%	1,0%	1,5%
Aspecto balonoso ^{NS}	1,00 ± 1,55	0,88 ± 0,99	1,71 ± 1,38	1,20 ± 1,30	0,83 ± 0,94	1,00 ± 1,73	2,00 ± 1,22				
Congestão dos sinusoides *	1,33 ± 0,82 ^{ab}	0,88 ± 0,64 ^{abc}	0,71 ± 0,49 ^{bc}	1,00 ± 0,71 ^{abc}	1,42 ± 0,90 ^{ab}	2,00 ± 1,00 ^a	0,40 ± 0,55 ^c				
Dilatação dos sinusoides *	0,83 ± 0,98 ^{abc}	0,88 ± 0,64 ^{abc}	0,71 ± 0,49 ^{bc}	1,00 ± 0,71 ^{abc}	1,42 ± 0,90 ^{ab}	2,00 ± 1,00 ^a	0,20 ± 0,45 ^c				
Hipertrofia dos hepatócitos ^{NS}	2,33 ± 1,03	1,63 ± 0,92	2,14 ± 1,21	2,00 ± 0,71	1,75 ± 0,87	2,33 ± 0,58	2,60 ± 0,55				
Infiltrado eosinofílico ^{NS}	0,83 ± 0,41	1,00 ± 1,07	0,71 ± 0,49	0,60 ± 0,55	0,75 ± 0,45	1,00 ± 1,00	0,80 ± 1,30				
Infiltrado linfocitário ^{NS}	0,67 ± 0,52	0,38 ± 0,52	0,43 ± 0,53	0,60 ± 0,55	0,33 ± 0,49	0,33 ± 0,58	0,20 ± 0,45				
Perda do aspecto cordonal ^{NS}	3,00 ± 0,00	2,50 ± 1,07	2,57 ± 1,13	3,00 ± 0,00	2,92 ± 0,29	2,00 ± 1,73	2,60 ± 0,89				
Perda estrutura do pâncreas ^{NS}	0,67 ± 0,82	0,38 ± 0,52	0,29 ± 0,49	0,60 ± 0,89	0,25 ± 0,45	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,45				
Macroesteatose *	0,33 ± 0,82 ^{ab}	0,13 ± 0,35 ^{ab}	0,14 ± 0,38 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,60 ± 0,89 ^a				
Microesteatose *	2,00 ± 1,55 ^a	0,00 ± 0,00 ^c	2,14 ± 1,46 ^a	1,40 ± 1,14 ^{ab}	0,67 ± 1,07 ^{bc}	1,67 ± 1,15 ^{ab}	2,20 ± 1,30 ^a				
Necrose *	0,83 ± 0,41 ^a	0,50 ± 0,53 ^{ab}	0,57 ± 0,53 ^{ab}	0,60 ± 0,55 ^{ab}	0,83 ± 0,39 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	0,20 ± 0,45 ^b				
Picnose ^{NS}	1,00 ± 0,00	1,50 ± 0,76	1,14 ± 0,90	1,40 ± 0,89	1,67 ± 0,78	1,33 ± 0,58	1,80 ± 1,30				

Tabela 5 – Intensidade de alterações histológicas no tecido cardíaco de tilápia-do-nilo após suplementação com óleos essenciais

Alterações	55 dias de suplementação						
	Controle		Gengibre		Manjerição		
	0,5%	1,0%	0,5%	1,0%	0,5%	1,0%	
Congestão no átrio ^{NS}	0,25 ± 0,62	0,00 ± 0,00	0,67 ± 1,21	0,60 ± 1,26	0,57 ± 1,13	1,33 ± 1,51	0,22 ± 0,44
Congestão no bulbo *	0,00 ± 0,00 ^b	0,67 ± 1,21 ^{ab}	0,50 ± 1,22 ^{ab}	0,20 ± 0,42 ^{ab}	0,86 ± 1,46 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^b	1,22 ± 1,48 ^a
Congestão no ventrículo ^{NS}	0,92 ± 0,51	0,83 ± 0,75	1,00 ± 1,26	0,70 ± 0,67	0,71 ± 0,49	1,00 ± 1,10	0,89 ± 1,05
Infiltrado eosinofílico ^{NS}	0,33 ± 0,49	0,50 ± 0,55	0,33 ± 0,52	0,70 ± 0,67	0,29 ± 0,49	0,17 ± 0,41	0,89 ± 0,93
Infiltrado linfocitário *	0,00 ± 0,00 ^b	0,33 ± 0,82 ^{ab}	1,00 ± 1,26 ^a	0,30 ± 0,48 ^{ab}	0,14 ± 0,38 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^b	0,78 ± 1,09 ^a
Microsteatose no átrio ^{NS}	1,42 ± 1,51	1,17 ± 1,47	2,17 ± 1,17	1,50 ± 1,58	1,43 ± 1,51	1,50 ± 1,64	1,00 ± 1,50
Microsteatose no bulbo ^{NS}	0,08 ± 0,29	0,33 ± 0,82	0,17 ± 0,41	0,60 ± 0,97	0,57 ± 1,13	0,17 ± 0,41	0,33 ± 0,71
Microsteatose ventrículo *	1,58 ± 0,51 ^a	1,67 ± 0,82 ^{ab}	1,00 ± 0,63 ^a	1,20 ± 0,42 ^{ab}	0,29 ± 0,95 ^{ab}	1,00 ± 0,00 ^b	1,22 ± 0,67 ^{ab}
Necrose ^{NS}	1,25 ± 1,36	0,83 ± 1,17	0,50 ± 1,22	1,60 ± 1,26	1,43 ± 1,13	2,00 ± 1,10	0,67 ± 0,71

Alterações	10 dias pós-infecção						
	Controle		Gengibre		Manjerição		
	0,5%	1,0%	0,5%	1,0%	0,5%	1,0%	
Congestão no átrio ^{NS}	0,00 ± 0,00 ^a	1,00 ± 1,26 ^b	0,13 ± 0,35 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Congestão no bulbo ^{NS}	0,00 ± 0,00	0,67 ± 1,03	0,13 ± 0,35	0,17 ± 0,41	0,40 ± 0,84	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Congestão no ventrículo ^{NS}	0,75 ± 0,50	1,00 ± 1,10	0,63 ± 0,74	0,33 ± 0,52	0,80 ± 0,79	0,33 ± 0,58	0,33 ± 0,58
Infiltrado eosinofílico ^{NS}	0,50 ± 0,58 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,17 ± 0,41 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
Infiltrado linfocitário *	0,25 ± 0,50	0,50 ± 0,55	0,13 ± 0,35	0,17 ± 0,41	0,10 ± 0,32	0,33 ± 0,58	0,33 ± 0,58
Microsteatose no átrio ^{NS}	1,50 ± 1,73	1,83 ± 1,47	1,50 ± 1,60	1,00 ± 1,55	0,90 ± 1,45	1,00 ± 1,73	1,00 ± 1,73
Microsteatose no bulbo *	1,60 ± 1,43 ^a	0,50 ± 0,84 ^{ab}	0,63 ± 0,92 ^{ab}	0,83 ± 1,33 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^b	0,33 ± 0,58 ^{ab}	0,67 ± 1,15 ^{ab}
Microsteatose ventrículo ^{NS}	1,25 ± 0,50	1,50 ± 0,84	1,38 ± 0,74	1,67 ± 0,82	1,80 ± 1,14	2,67 ± 0,58	1,33 ± 0,58
Necrose ^{NS}	2,00 ± 1,15	1,33 ± 1,21	1,63 ± 1,30	1,50 ± 1,38	1,80 ± 0,92	2,33 ± 1,15	2,00 ± 1,00

Tabela 6 – Intensidade de alterações histológicas nas brânquias de tilápia-do-nilo suplementada com óleos essenciais de
55 dias de suplementação

Alterações	Controle	Gengibre			Manjerição		
		0,5%	1,0%	1,5%	0,5%	1,0%	1,5%
Aneurisma ^{NS}	0,20 ± 0,42	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,76	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Congestão do veio central ^{NS}	0,60 ± 0,84	0,60 ± 0,89	0,14 ± 0,38	0,50 ± 0,80	0,25 ± 0,46	0,14 ± 0,38	0,83 ± 1,17
Dilatação do veio central ^{NS}	1,00 ± 0,82	1,20 ± 0,84	0,71 ± 0,76	0,67 ± 0,89	0,50 ± 0,53	0,71 ± 1,25	0,83 ± 1,17
Congestão na base da LS ^{NS}	0,20 ± 0,42	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,78	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,38	0,17 ± 0,41
Descolamento epitélio da LS *	1,20 ± 1,03 ^a	0,20 ± 0,45 ^b	0,43 ± 0,53 ^{ab}	0,67 ± 1,07 ^{ab}	0,13 ± 0,35 ^b	0,14 ± 0,38 ^b	0,50 ± 0,55 ^{ab}
Dilatação seio venoso ^{NS}	0,20 ± 0,42	0,20 ± 0,45	0,29 ± 0,49	0,08 ± 0,29	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,82
Edema justalamelar ^{NS}	1,40 ± 0,97	0,80 ± 0,45	1,57 ± 0,79	1,42 ± 0,90	0,75 ± 0,46	1,43 ± 0,79	1,33 ± 0,82
Fusão de LS ^{NS}	0,21 ± 0,67	0,49 ± 1,10	0,29 ± 0,76	0,23 ± 0,79	0,18 ± 0,52	0,18 ± 0,49	0,21 ± 0,52
Hiperplasia interlamelar ^{NS}	2,70 ± 0,95	2,40 ± 0,89	2,43 ± 0,98	2,50 ± 1,17	2,50 ± 0,93	2,57 ± 1,13	3,00 ± 0,00
Hiperplasia da LS *	0,90 ± 0,57 ^a	0,60 ± 0,55 ^{ab}	0,29 ± 0,49 ^b	0,42 ± 0,51 ^b	0,75 ± 0,46 ^{ab}	0,71 ± 0,49 ^{ab}	1,00 ± 0,63 ^a
Infiltrado eosinofílico ^{NS}	0,60 ± 0,52	0,40 ± 0,89	0,43 ± 0,53	0,42 ± 0,67	0,25 ± 0,71	0,71 ± 1,11	0,83 ± 0,75
Infiltrado linfocitário ^{NS}	0,30 ± 0,67	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,38	0,33 ± 0,49	0,00 ± 0,00	0,43 ± 0,53	0,33 ± 0,52
Telangiectasia *	0,10 ± 0,32 ^{ab}	0,20 ± 0,45 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^b	0,25 ± 0,45 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^b	0,43 ± 0,53 ^a	0,17 ± 0,41 ^{ab}

Tabela 6 – continuação.

Alterações	10 dias pós-infecção											
	Controle			Gengibre			Manjeriço					
	0,5%	1,0%	1,5%	0,5%	1,0%	1,5%	0,5%	1,0%	1,5%			
Aneurisma ^{NS}	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,38	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,02	0,00 ± 0,03			
Congestão do veio central ^{NS}	0,20 ± 0,45	0,43 ± 0,79	0,38 ± 0,52	0,38 ± 0,52	0,71 ± 0,95	0,25 ± 0,45	0,25 ± 0,45	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00			
Congestão na base da LS *	1,75 ± 1,26 ^a	0,43 ± 0,79 ^{ab}	1,00 ± 0,53 ^{ab}	1,00 ± 0,53 ^{ab}	0,57 ± 0,79 ^{ab}	0,75 ± 1,06 ^{ab}	0,75 ± 1,06 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b			
Descolamento do epitélio da LS ^{NS}	0,40 ± 0,89	0,29 ± 0,49	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,39	0,17 ± 0,39	1,00 ± 1,41	0,60 ± 0,55			
Dilatação do seio venoso ^{NS}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,39	0,17 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00			
Edema justalamelar ^{NS}	1,20 ± 1,30	0,86 ± 1,07	1,75 ± 0,71	1,75 ± 0,71	1,71 ± 0,76	1,08 ± 1,00	1,08 ± 1,00	1,50 ± 0,71	1,00 ± 0,71			
Fusão de LS *	0,40 ± 0,55 ^{ab}	0,14 ± 0,38 ^b	0,75 ± 0,71 ^a	0,75 ± 0,71 ^a	0,86 ± 0,69 ^a	0,92 ± 0,29 ^a	0,92 ± 0,29 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	0,40 ± 0,55 ^{ab}			
Hiperplasia interlamelar ^{NS}	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	2,75 ± 0,87	2,75 ± 0,87	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00			
Hiperplasia da LS ^{NS}	0,60 ± 0,55	0,57 ± 0,53	0,75 ± 0,46	0,75 ± 0,46	0,43 ± 0,53	0,67 ± 0,49	0,67 ± 0,49	1,00 ± 0,00	0,60 ± 0,55			
Infiltrado eosinofílico ^{NS}	0,80 ± 0,84	1,00 ± 1,15	1,25 ± 0,71	1,25 ± 0,71	1,43 ± 1,27	1,00 ± 0,85	1,00 ± 0,85	2,00 ± 1,41	1,20 ± 1,30			
Infiltrado linfocitário ^{NS}	0,00 ± 0,00	0,43 ± 1,13	0,13 ± 0,35	0,13 ± 0,35	0,14 ± 0,38	0,17 ± 0,39	0,17 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,89			
Telangiectasia ^{NS}	0,20 ± 0,45	0,57 ± 0,53	0,13 ± 0,35	0,13 ± 0,35	0,29 ± 0,49	0,25 ± 0,45	0,25 ± 0,45	0,50 ± 0,71	0,20 ± 0,45			

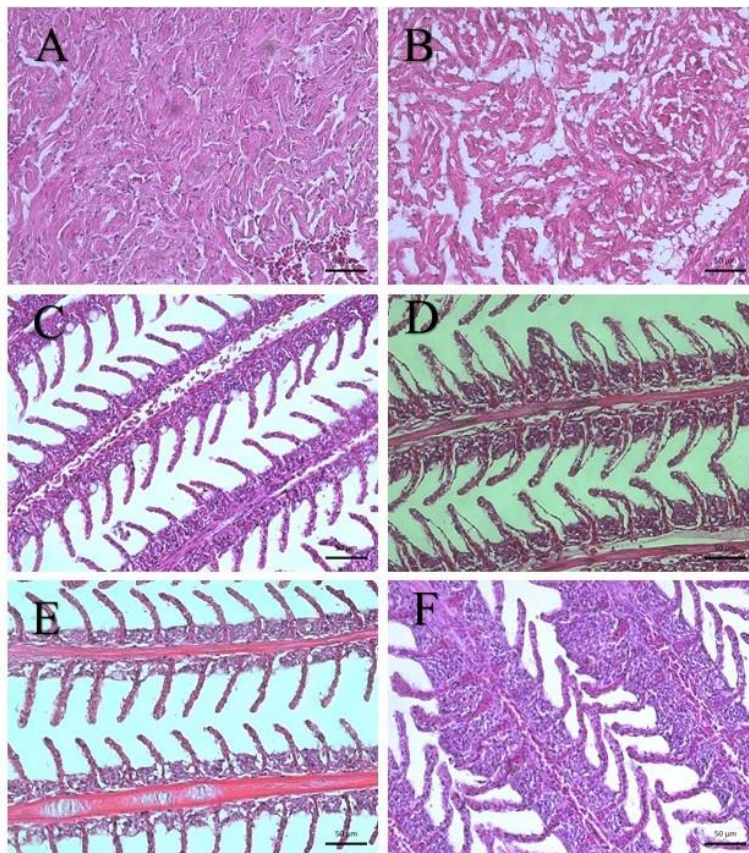


Fig. 2. Alterações histológicas em tilápias-do-nylo após 55 dias de suplementação. A: Tecido cardíaco de peixe tratado com manjeriço a 1,0%, sem esteatose; B: Microesteatose cardíaca em peixe do grupo controle; C: Tecido branquial de peixe tratado com manjeriço a 0,5%; D: Tecido branquial de peixe do grupo controle, com descolamento do epitélio da lamela secundária; E: Tecido branquial de peixe tratado com gengibre a 1,0%, mostrando baixo grau de hiperplasia interlamelar; F: Tecido branquial de peixe do grupo controle, com grau moderado de hiperplasia interlamelar e fusão de lamelas secundárias. Coloração: HE, Barra: 50 μ m.

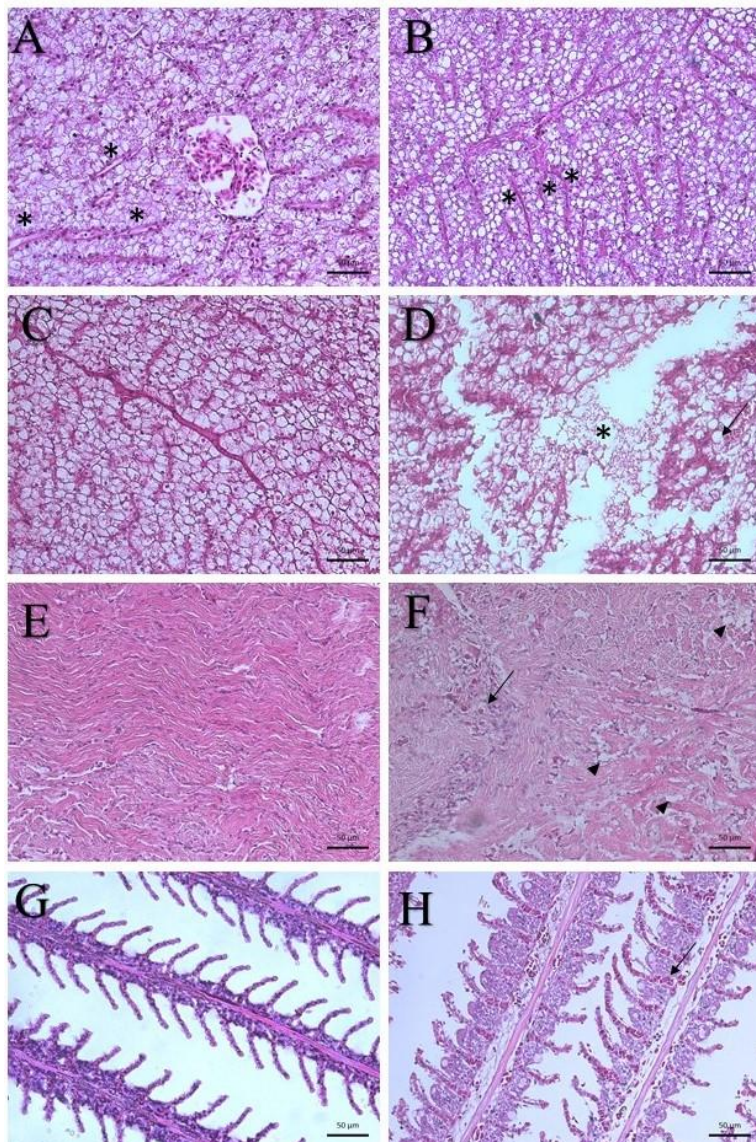


Fig. 3. Alterações histológicas em tilápias-do-nilo dez dias após infecção com *Streptococcus agalactiae*. A: Tecido hepático de peixe tratado com manjericao a 0,5%, mostrando sinusoides liberados (asteriscos) B: Tecido hepático de peixe do grupo controle, com sinusoides congestionados (asteriscos); C: Tecido hepático de peixe tratado com manjericao a 0,5%, hepatócitos com formato hexagonal

típico; D: Tecido hepático de peixe do grupo controle, com área de necrose (asterisco), microesteatose e hepatócitos com aspecto balonoso; E: Tecido cardíaco de peixe tratado com manjeriço a 0,5%, mostrando aspecto normal; F: Tecido cardíaco de peixe do grupo controle, com microesteatose (cabeças de seta), necrose e infiltrado inflamatório eosinofílico; G: Brânquia de peixe tratado com manjeriço a 1,5%, sem congestão; H: Brânquia de peixe do grupo controle, com congestão na base das lamelas secundárias (seta). Coloração: HE, Barra: 50 µm.

O aumento na superfície dos vilos indica melhoria na saúde intestinal e aumento na capacidade de absorção de nutrientes (Mohamed et al., 2014), podendo favorecer a sobrevivência dos peixes à infecção.

Os peixes tratados por 55 dias não apresentaram diferença no número de células caliciformes nos vilos intestinais, em comparação com o controle. Corroborando o presente resultado, dietas suplementadas com óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) durante 60 dias também não proporcionaram diferença significativa no número de células caliciformes no intestino de tilápia-do-nylo (Valladão et al., 2017). Após a infecção, os peixes alimentados com gengibre a 1,0% e manjeriço a 0,5% apresentaram aumento significativo no número de células caliciformes nos vilos intestinais. É possível que estes tratamentos tenham proporcionado aumento na produção de muco para combater a infecção. O muco exerce importantes funções relacionadas à imunidade. Além de servir como barreira mecânica, dificultando a aderência de bactérias patogênicas, o muco contém diversos componentes da resposta imune inata, como lisozima, imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento, lectinas e diversos outros componentes antimicrobianos (Subramanian et al., 2007). Quando o patógeno se instala no animal via trato digestório, inicia-se o processo de infecção a partir da colonização da mucosa intestinal, portanto, a produção de muco no intestino é essencial para evitar o estabelecimento da enfermidade (Mohamed et al., 2014). Pode-se inferir que os peixes tratados com gengibre a 1,0% e manjeriço a 0,5% mostraram-se mais capacitados a desenvolver esta resposta durante a infecção.

Uma das alterações mais frequentes no intestino foi a necrose dos vilos, que apesar de não demonstrar diferença entre os tratamentos, foi menos intensa no período pós-infecção. Considerando que após a infecção a maior parte dos peixes deixou de se alimentar, é possível que este dano tenha sido causado pela composição da dieta. Aos 55 dias de suplementação, peixes tratados com gengibre a 1,5% mostraram redução do infiltrado linfocitário no intestino. Este efeito pode ter ocorrido

devido à ação anti-inflamatória dos compostos presentes no gengibre (Grzanna et al., 2005).

No fígado, aos 55 dias de suplementação, o grau de congestão dos sinusoides não diferiu entre o controle e os animais alimentados com ração suplementada, embora tenha havido diferença entre os peixes tratados, sendo este efeito possivelmente dependente da dose. Em estudo com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a ocorrência de congestão hepática esteve relacionada à inclusão de óleos essenciais de menta (*Mentha spicata*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e sálvia (*Salvia* sp.) a 1,5% na dieta, indicando a toxicidade desta dose (Sönmez et al., 2015). Dez dias após a infecção, os peixes tratados com gengibre a 1,5% mostraram maior grau de congestão no pâncreas, reforçando esta hipótese. Porém, a suplementação com manjerição a 1,5% diminuiu o grau de picnose nos hepatócitos, condição degenerativa que precede a morte celular (Santos et al., 2008). Após a infecção, houve também maior ocorrência de esteatose no fígado, sendo esta uma das alterações registradas no tecido hepático de tilápias (*Oreochromis* sp.) infectadas natural e experimentalmente por *Streptococcus agalactiae* (Chen et al., 2007; Razzak et al., 2017). De acordo com Chen et al. (2007), a microesteatose hepática é uma alteração frequentemente observada em peixes cultivados, não sendo necessariamente causada pela infecção, mas sim por inadequações na formulação das dietas comerciais. A intensidade de microesteatose hepática mostrou redução significativa nos peixes alimentados com gengibre e manjerição a 0,5%. Portanto, é possível afirmar que os óleos essenciais tenham proporcionado efeito hepatoprotetor perante a infecção.

Estudos em roedores demonstraram que a administração de 1,8-cineol durante oito semanas e de citral durante sete dias reduziu a esteatose hepática, corroborando o presente resultado (Murata et al., 2015, Uchida et al., 2017). Em garoupas (*Epinephelus fuscoguttatus*) alimentadas com gengibre em pó por oito semanas, também se observou redução da esteatose hepática (Apines-Amar et al., 2013). Em concentrações mais elevadas, os óleos proporcionaram grau de microesteatose similar ao do controle, possivelmente por resultarem em maior ingestão de lipídios (Gatta et al., 2011), anulando o efeito hepatoprotetor.

O grau de macroesteatose foi similar ao controle em todos os peixes tratados, porém, mais intenso no tratamento com manjerição a 1,5% em comparação com gengibre a 1,5% e manjerição a 0,5% e 1,5%. É possível que o efeito dos óleos sobre a estocagem de lipídios no tecido hepático seja dependente da dose administrada. Neste caso, a dose de

1,5% para o óleo de manjeriço mostrou-se excessiva, causando extensas áreas de acúmulo de gordura no fígado.

No período pós-desafio, a perda do aspecto cordonal típico dos sinusoides foi a alteração que ocorreu com maior intensidade, sendo este resultado previamente registrado no fígado de tilápias-do-nylo infectadas com *S. agalactiae* via gavagem (Yamashita et al., 2017), corroborando o presente resultado e indicando que a inoculação via gavagem foi capaz de reproduzir a infecção com sucesso. No presente estudo, necrose do tecido hepático foi observada inclusive em peixes não-infectados. Tilápias-do-nylo não infectadas mostraram necrose multifocal no tecido hepático com prevalência de 60% (Yamashita et al., 2017). Portanto, pode-se dizer que esta alteração não está necessariamente ligada à enfermidade, podendo ocorrer em função de alterações na dieta (Chen et al., 2007). Após a infecção, peixes tratados com manjeriço 1,5% mostraram redução significativa no grau de necrose hepática, indicando efeito hepatoprotetor. Corroborando este resultado, em tilápias-do-nylo, a suplementação com *Aloe vera* em pó durante oito semanas proporcionou efeito hepatoprotetor por intensificação da atividade de enzimas antioxidantes (Gabriel et al., 2015).

No baço, tanto aos 55 dias como após a infecção nenhuma das dietas suplementadas proporcionou alteração em comparação com o controle. Isto indica que a suplementação, mesmo em doses mais elevadas, não causou prejuízo estrutural ao tecido esplênico.

Quanto ao tecido cardíaco, os peixes tratados com gengibre a 1,0% e manjeriço a 1,5% apresentaram intensificação do infiltrado linfocitário, podendo ser resultante de estimulação da resposta imune, porém, este efeito não persistiu após a infecção. Segundo Chen et al. (2007), a presença de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco é comum em tilápias infectadas com *S. agalactiae*. No presente estudo, após a infecção, todas as dietas suplementadas proporcionaram redução na intensidade de infiltrado eosinofílico no coração. Os compostos majoritários dos óleos (1,8-cineol e citral) possuem atividade anti-inflamatória (Cho et al., 2012; Mitoshi et al., 2014), o que pode ter causado este efeito de reduzir a infiltração de eosinófilos.

A ocorrência de microesteatose no coração foi mais intensa no período pós-infecção. A esteatose cardíaca pode ocorrer como resposta a deficiências nutricionais ou ao jejum (Courrèges et al., 2003). No presente estudo, os peixes cessaram a alimentação após o desafio, portanto, o acúmulo de gordura no tecido cardíaco e hepático dez dias após a infecção pode ter sido uma resposta para evitar a depleção de energia em órgãos vitais. Porém, também é possível que esta alteração

tenha sido causada pela infecção. Herman et al. (1985) observaram vacuolização intracelular no tecido cardíaco de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas com *Lactobacillus* sp. A suplementação com óleo essencial de manjeriço proporcionou redução significativa no grau de microesteatose cardíaca, tanto antes quanto após a infecção. É possível que o 1,8-cineol presente neste óleo tenha proporcionado redução na esteatose cardíaca, além da hepática (Murata et al., 2015).

Alterações na morfologia branquial podem ocorrer devido à ação de substâncias tóxicas, por isso, a análise das brânquias é utilizada em estudos de avaliação de toxicidade de compostos de origem vegetal (Falkenberg et al., 2003). Aos 55 dias de suplementação, peixes tratados com gengibre a 0,5% e manjeriço a 0,5% e 1,0% mostraram redução no grau de descolamento do epitélio da lamela secundária, bem como os tratados com gengibre a 1,0% e 1,5%, que apresentaram redução da hiperplasia interlamelar. Estas alterações são comuns em peixes de cultivo intensivo, podendo ser causadas pelo estresse, adensamento, inadequações na qualidade da água e na dieta (Reis et al., 2009), e a suplementação na dieta com óleos essenciais mostrou-se capaz de amenizá-las.

Após a infecção observou-se redução da congestão na base das lamelas secundárias nos peixes tratados com manjeriço a 1,0% e 1,5%. Congestão nas brânquias foi previamente relatada em jundiá (*Rhamdia quelen*) após infecção com *Streptococcus agalactiae* (Baldissera et al., 2017), sendo esta condição prejudicial à eficácia das trocas gasosas. O óleo essencial de manjeriço possivelmente teve efeito protetor sobre o tecido branquial, impedindo que a infecção causasse maiores danos e perda de funcionalidade às brânquias.

As alterações histológicas causadas por um patógeno podem variar, mostrando que o comportamento da infecção depende não somente do agente patogênico, mas também do estado de saúde do animal infectado (Chen et al., 2007). Peixes em melhor estado nutricional e imunológico são mais aptos a controlar a infecção e apresentam menor severidade nos danos teciduais. Alterações histopatológicas relacionadas à inclusão de óleos essenciais na dieta podem estar relacionadas à toxicidade de determinados constituintes do óleo, doses excessivas ou condições alérgicas. Porém, os óleos oferecem efeitos benéficos quando utilizados em dose adequada (Yılmaz et al., 2012, Sönmez et al., 2015). Apesar dos efeitos negativos relacionados às doses mais altas, os óleos mostraram-se úteis para aumentar a resposta

imune e reduzir os danos teciduais causados pela infecção por *S. agalactiae*.

5. Conclusões

Os óleos essenciais de manjeriço-cravo e gengibre adicionados à dieta de tilápia-do-nylo, quando utilizados em dose moderada, mostraram efeito protetor no tecido hepático, cardíaco e branquial, amenizando os danos provocados pela infecção por *Streptococcus agalactiae*, além de proporcionar melhoria na saúde intestinal e na capacidade de absorção de nutrientes.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (MP2-01/2012) pelo auxílio financeiro, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado a A. Brum, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e bolsa a M. L. Martins (CNPq 305869/2014-0), à Nicoluzzi Rações (Penha-SC) pela ração utilizada no experimento, ao Laboratório Acquapiscis pela cepa bacteriana utilizada no desafio, ao Dr. Eduardo Cargnin Ferreira (Instituto Federal de Santa Catarina - IFSC), Dra. Gabriela Tomas Jerônimo (Universidade Niltons Lins), Dr. Felipe do Nascimento Vieira (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC), Dr. André Luis Ferreira Lima (UFSC) e Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque (UFSC) pela revisão crítica do manuscrito.

7. Referências

- Absali, H., Mohamad, S., 2010. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants. J. Anim. Vet. Adv. 9 (13), 1839–1847.
- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. 4th ed. Allured Publishing Co, Carol Stream, Illinois.
- Ali, B.H., Blunden, G., Tanira, M.O., Nemmar, A., 2008. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. Food Chem. Toxicol. 46, 409-420.

- Antache, A., Cristea, V., Grecu, I., Dediu, L., Cretu, M., Petrea, S.M., 2014. The influence of some phytobiotics on haematological and some biochemical indexes at *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.* 47 (1), 192-199.
- Apines-Amar, M.J.S., Amar, E.C., Faisan Jr., J.P., 2013. Growth, plasma cortisol, liver and kidney histology, and resistance to vibriosis in brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* fed onion and ginger. *AAACL Bioflux.* 6 (6), 530-538.
- Awad, E., Awaad, A., 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 67, 40-54.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Júnior, G.B., Vargas, A.C., Boligon, A.A., Campos, M.M.A., Stefani, L.M., Baldisseroto, B., 2017. *Melaleuca alternifolia* essential oil enhances the non-specific immune system and prevents oxidative damage in *Rhamdia quelen* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*: Effects on cholinergic and purinergic systems in liver tissue. *Fish Shellfish Immunol.* 61, 1-8.
- Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 457-472.
- Brum, A., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mourinho, J.L.P., Martins, M.L., 2017. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 468, 235-243.
- Chen, C.Y., Chao, C.B., Bowser, P.R., 2007. Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae*-infected tilapia. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 27(1), 2-9.
- Cho, K.H., 2012. 1,8-cineole protected human lipoproteins from modification by oxidation and glycation and exhibited serum lipid-lowering and anti-inflammatory activity in zebrafish. *BMB Reports.* 45 (10), 565-570.
- Courrèges, M.C., Benencia, F., Uceda, A., Monserrat, A.J., 2003. Effect of dietary choline deficiency on immunocompetence in Wistar rats. *Nutr. Res.* 23, 519-526.
- Dairiki, J.K., Majolo, C., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Oliveira, M.R., Morais, I.S., 2013. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100643/1/Circ-Tec-42.pdf> (acesso 02.05.17)
- Düğenci, S.K., Arda, N., Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *J. Ethnopharmacol.* 88, 99-106.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Pasnik, D.J., Bohnsack, J.F., 2009. Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerg. Infect. Dis.* 15 (5), 774-776.

- Falkenberg M.B., Santos R.I., Simões C.M.O., 2003. Introdução à análise fitoquímica In: Simões C.M.O. (Ed.), Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 5ª ed. UFRGS/UFSC, Porto Alegre. p. 229-245.
- FAO, 2017. FIGIS – Fisheries Statistics. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en> (accessed 13.05.2017).
- Gabriel, N.N., Qiang, J., Ma, X.Y., He, J., Xu, P., Liu, K., 2015. Dietary *Aloe vera* improves plasma lipid profile, antioxidant, and hepatoprotective enzyme activities in GIFT-tilapia (*Oreochromis niloticus*) after *Streptococcus iniae* challenge. Fish Physiol. Biochem. 41, 1321-1332.
- Gatta, P.P., Parma L., Guarniero I., Mandrioli L., Sirri R., Fontalinas R., Bonaldo A., 2011. Growth, feed utilization and liver histology of juvenile common sole (*Solea solea* L.) fed isoenergetic diets with increasing protein levels. Aquacult. Res. 42, 313-321.
- Grzanna, R., Lindmark, L., Frondoza, C.G., 2005. Ginger - an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. J. Med. Food. 8 (2), 125-132.
- Haniffa, M.A., Kavitha, K., 2012. Antibacterial activity of medicinal herbs against the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. J. Agr. Technol. 8 (1), 205-211.
- Hassanin, M.E.S., Hakim, Y., Badawi, M.E.S., 2014. Dietary effect of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on growth performance, immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*. Abbassa. Int. J. Aqua. 7 (1), 35-52.
- Herman, R.L., McAllister, K., Bullock, G.L., Shotts, E.B., 1985. Postspawning mortality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) associated with *Lactobacillus*. J. Wildl. Dis. 21 (4), 358-360.
- Kone, M., Cisse, M., Affourmou, K., Soric, R.E., Fantodji, A., Miron, D.L., 2013. In vivo antiparasitic effects of an African's traditional plant *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1758) on fish louse *Argulus* spp. infesting the Nile tilapia males *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in fish farming. Open Sci. Repos. Vet. Med. doi: 10.7392/openaccess.23050447
- Marcel, G., Sabri, M.Y., Siti-Zahrah, A. and Emikpe, O.B. (2013) Water condition and identification of potential pathogenic bacteria from red tilapia reared in cage-cultured system in two different water bodies in Malaysia. Afr. J. Microbiol. Res., 7(47): 5330-5337.
- McLafferty, F.W., Stauffer, D.B., 1994. Registry of Mass Spectral Data, 6th Electronic Edition, Wiley: New York.
- Mitoshi, M., Kuriyama, I., Nakayama, H., Miyazato, H., Sugimoto, K., Kobayashi, Y., Jippo, T., Kuramochi, K., Yoshida, H., Mizushina, Y.,

2014. Suppression of allergic and inflammatory responses by essential oils derived from herbal plants and citrus fruits. *Int. J. Mol. Med.* 33 (6), 1643-1651.
- Mohamed, M. A., El-Daly, E. F., El-Azeem, N. A. A., Youssef, A. W., Hassan, H. M. A., 2014. Growth performance and histological changes in ileum and immune related organs of broilers fed organic acids or antibiotic growth promoter. *Int. J. Poult. Sci.* 13(10), 602-610.
- MSD Animal Health, 2012. Technical Bulletin: streptococcus in the tilapia environment. http://aqua.merck-animalealth.com/binaries/AquaVac_StreSa_tech01_0Nov12_050STREP_tcm56-35564.pdf (accessed 27.05.2017).
- Murata, S., Ogawa, K., Matsuzaka, T, Chiba, M., Nakayama, K., Iwasaki, K., Kurokawa, T., Sano, N., Tanoi, T., Ohkohchi, N., 2015. 1,8-Cineole ameliorates steatosis of pten liver specific KO Mice via akt inactivation. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (6), 12051-12063.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., Pettersson, S., 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336 (6086), 1262–1267.
- Nya, E.J., Austin, B., 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Dis.* 32, 971-977.
- Punitha, S.M.J., Babu, M.M., Sivaram, V., Shankar, V.S., Dhas, S.A., Mahesh, T.C., Immanuel, G., Citarasu, T., 2008. Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in grouper *Epinephelus tauvina* juveniles against *Vibrio harveyi* infection. *Aquacult. Int.* 16, 511-523.
- Razzak, L.A., Ambak, M.A., Hassan, M., Sheriff, S.M., Nadirah, M., Draman, A.S., Wahab, W., Nurhafizah, W.W.I., Alia, S.A., Jabar, A., Najiah, M. Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet. World.* 10, 101-111.
- Reis, A.B., Sant'Ana, D.M.G., Azevedo, J.F., Merlini, L.S., Araújo, E.J.A., 2009. The influence of the aquatic environment in tanks sequentially interconnected with PVC pipes on the gill epithelium and lamellas of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pesq. Vet. Bras.* 29 (4), 303-311.
- Santos, N.M.S., Vale, A.D., Reis, M.I.R., Silva, M.T., 2008. Fish and apoptosis: molecules and pathways. *Curr. Pharm. Des.* 14 (2), 148-169.
- Schwaiger, J., Wande, R., Adm, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R., 1997. The use of histopathologic indicators to evaluate contaminant related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* 6, 75–86.

- Silva, L.D.L., Parodi, T.V., Reckziegel, P., Garcia, V.D.O., Bürger, M.E., Baldisserotto, B., Malmann, C.A., Pereira, A.M.S., Heinzmann, B.R., 2012. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 350, 91-97.
- Sivaram, V., Babu, M.M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T., Marian, M.P., 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture* 237, 9-20.
- Sönmez, A.Y., Bilen, S., Albayrak, M., Yilmaz, S., Biswas, G., Hisar, O., Yanik, T., 2015. Effects of dietary supplementation of herbal oils containing 1,8-cineole, carvacrol or pulegone on growth performance, survival, fatty acid composition, and liver and kidney histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 15, 813-819.
- Subramanian, S., MacKinnon, S.L., Ross, R.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 148 (3), 256-263.
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., Bolong, A.M.A., 2013. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 400, 46-52.
- Uchida, N.S., Silva-Filho, S.E., Cardia, G.F.E., Cremer, E., Silva-Comar, F.M.S., Silva, E.L., Bersani-Amado, C.A., Cuman, R.K.N., 2017. Hepatoprotective effect of citral on acetaminophen-induced liver toxicity in mice. *J. Evid. Based Altern. Med.*, 1-9. DOI: 10.1155/2017/1796209
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pala, G., Jesus, R.B., Kotzent, S., Costa, J.C., Silva, T.F.A., Pilarski, F., 2017. Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquac. Res.* 1, 1-10. DOI: 10.1111/are.13386.
- Yamashita, M.M., Pereira, S.A., Cardoso, L., Araújo, A.P., Oda, C.E., Schmidt, E.C., Bouzon, Z.L., Martins, M.L., Mourião, J.L.P., 2017. Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. *Aquac. Nutr.* 00, 1-9. DOI: 10.1111/anu.12498
- Yılmaz, S., Ergün, S., Soytas, N., 2013. Herbal supplements: useful tools for preventing streptococcal disease during first-feeding of tilapia fry, *Oreochromis mossambicus*. *Isr. J. Aquacult.* 26 (3), 144-148.

CONCLUSÕES GERAIS

A suplementação dietária com óleos essenciais de manjeriço-cravo (*Ocimum gratissimum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) mostrou-se um recurso útil para melhorar a resistência a enfermidades em juvenis de tilápia, além de incrementar o desempenho zootécnico, no caso do manjeriço-cravo. Contudo, estes resultados são dependentes da dose. Dentre os efeitos positivos observados, pode-se destacar a melhoria significativa da conversão alimentar, observado nos peixes tratados com óleo essencial de manjeriço a 0,5%. Contudo, doses elevadas a 1,5% proporcionaram efeitos indesejáveis no crescimento e em parâmetros hematológicos, o que indica possível toxicidade relacionada a estes tratamentos. Em relação aos parâmetros imunológicos, destaca-se o aumento da atividade fagocitária dos leucócitos contra a bactéria *Streptococcus agalactiae* em peixes que receberam dieta suplementada. Este resultado indica que todas as doses foram efetivas em tornar o sistema imune mais capacitado para combater o patógeno, podendo a dose mais baixa (0,5%) ser utilizada para este fim. As concentrações séricas de colesterol e triglicérides foram significativamente reduzidas em peixes tratados com óleos essenciais, o que sugere que os óleos tenham capacidade de interferir no metabolismo de lipídios, porém, sem efeito prejudicial. De acordo com as análises histológicas, os óleos essenciais mostraram-se produtos seguros, pois, apesar de alguns resultados indesejáveis em doses mais altas, não foram observados danos significativos e nem perda de funcionalidade relacionada à suplementação nos órgãos analisados. Observou-se, inclusive, efeito protetor no tecido cardíaco, hepático e branquial após o desafio com *Streptococcus agalactiae*, portanto, os óleos na dieta podem servir para prevenir infecções e também para reduzir os danos teciduais por elas causados.

As dietas suplementadas com óleos essenciais na concentração de 0,5% proporcionaram os melhores resultados, considerando o desempenho zootécnico, parâmetros hemato-imunológicos e aspectos histológicos. Futuros estudos são necessários para testar os efeitos de doses intermediárias destes óleos, para determinar a concentração ideal que proporcione os efeitos benéficos observados neste estudo. Por fim, tendo maior conhecimento sobre o mecanismo de ação destes óleos separadamente, é possível testar a administração de misturas entre eles, para verificar possíveis efeitos sinérgicos.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ABBASI-GHADIKOLAEI, H.; KAMALI, A.; SOLTANI, M.; SHARIFIAN, M. Effects of *Zingiber officinale* powder on growth parameters, survival rate and biochemical composition of body in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 16, n. 1, p. 67-85, 2017.

ABUSELIANA, A.; DAUD, H.; AZIZ, S.A.; BEJO, S.K.; ALSAID, M. *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis* sp.). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, p. 2640–2646, 2010.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.

ADEWALE, A.Y.; ADESHINA, I.; YUSUF, O.Y. Anaesthetic effect of *Ocimum gratissimum* extract on *Oreochromis niloticus* juveniles. **European Journal of Experimental Biology**, v. 7, n. 1, p. 1-4, 2017.

AKAH, P.A.; JOHN-AFRICA, L.; NWORU, C.S. Gastro-protective properties of the leaf extracts of *Ocimum gratissimum* L. against experimental ulcers in rat. **International Journal of Pharmacology**, v. 3, p. 461-467, 2007.

AL-HARBI, A. H. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). **Aquaculture**, v. 464, p. 515–520, 2016.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, 325–354, 2007.

ALI, B.H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M.O.; NEMMAR, A.; Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 409–420, 2008.

ALSAID, M.; DAUD, H.; BEJO, S.K.; ABUSELIANA, A. Antimicrobial activities of some culinary spice extracts against *Streptococcus agalactiae* and its prophylactic uses to prevent streptococcal infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 2, p. 532-538, 2010.

AMAR, E.C.; KIRON, V.; SATOH; OKAMOTO, N.; WATANABE, T. Effect of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science**, v. 66, p. 1068-1075, 2000.

ANTACHE, A.; CRISTEA, V.; GRECU, I.; DEDIU, L.; CRETU, M.; PETREA, S.M. The influence of some phytobiotics on haematological and some biochemical indexes at *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies**, v. 47, n. 1, p. 192-199, 2014.

ANYANWU, D.C.; ORUSHA, J.O.; OFFOR, J.I. Effects of *Ocimum gratissimum* leaf meal on carcass composition and quality of *Claria gariepinus*. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 6, n. 11, 532-535, 2012.

AMBORSKI, R.L.; SNIDER, T.G.; THUNE, R.L.; CULLEY, D.D. A non-hemolytic, group B *Streptococcus* infection of cultured bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 19, p. 180-184, 1983.

AMEND, D. Potency testing of fish vaccines. **Developments in Biological Standardization**, v. 49, p. 447-454, 1981.

AMIRKANI, N.; FIROUZBAKHS, F. Protective effects of basil (*Ocimum basilicum*) ethanolic extract supplementation diets against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture Research**, v. 46, n. 3, p. 716-724, 2013.

APINES-AMAR, M.J.S.; AMAR, E.C.; FAISAN JR., J.P. Growth, plasma cortisol, liver and kidney histology, and resistance to vibriosis in brown marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* fed onion and ginger. **AAFL Bioflux**, v. 6, n. 6, p. 530-538, 2013.

AUSTIN, B., AUSTIN, D.A., 2013. **Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish**. fifth ed. Springer, Dordrecht, Netherlands.

AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 67, p. 40-54, 2017.

BANDEIRA JR., G.; PÊS, T.S.; SACCOL, E.M.H.; SUTILI, F.J.; ROSSI JR., W.R.; MURARI, A.L.; HEINZMANN, B.M.; PAVANATO, M.A.; VARGAS, A.C.; SILVA, L.L.; BALDISSEROTTO, B. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 484-491, 2017.

BARATO, P., MARTINS, E.R., MELO-CRISTINO, J., IREGUI, C.A., RAMIREZ, M. Persistence of a single clone of *Streptococcus agalactiae* causing disease in tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured in Colombia over 8 years. **Journal of Fish Diseases**, v. 38, p. 1083–1087, 2015.

BARROSO, R.M.; PINCINATO, R.B.M.; MUNOZ, A.E.P. **O mercado da tilápia: 2º trimestre de 2017 e análise da estrutura do preço da tilápia no varejo.** Embrapa Informativo Mercado da Tilápia n. 11. Disponível em:
<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162159/1/CNPA-SA-2017-mt11.pdf>> Acesso em: 2 agosto 2017.

BENOVIT, S.C.; GRESSLER, L.T.; SILVA, L.L.; GARCIA, L.O.; OKAMOTO, M.H.; PEDRON, J.S.; SAMPAIO, L.A.; RODRIGUES, R.V.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia and transport of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, n. 6, p. 896–900, 2012.

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

BISHOP, E.J.; SHILTON, C.; BENEDICT, S.; KONG, F.; GILBERT, G.L.; GAL, D. Necrotizing fasciitis in captive juvenile *Crocodylus porosus* caused by *Streptococcus agalactiae*: an outbreak and review of

the animal and human literature. **Epidemiology and Infection**, v. 135, p. 1248–1255, 2007.

BLAXHALL, P.C.; DAISLEY, K.W. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, v. 5, p. 771-781, 1973.

BOIJINK, C.L.; QUEIROZ, C.A.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; INOUE, L.A.K.A. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 457, p. 24-28, 2016.

BRABO, M.F.; PEREIRA, L.F.S.; SANTANA, J.V.M.; CAMPELO, D.A.V.; VERAS, G.C. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase da aquicultura. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 50-58, 2016.

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

BROCHET, M.; COUVE, E.; ZOUINE, M.; VALLAEYS, T.; RUSNIOK, C.; LAMY, M.C. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1227–1243, 2006.

BRUM, A.; PEREIRA, S.A.; OWATARI, M.S.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; MOURIÑO, J.L.P.; MARTINS, M.L. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 468, p. 235-243, 2017.

BULFON, C.; VOLPATTI, D.; GALEOTTI, M. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. **Aquaculture Research**, v. 46, p. 513–551, 2015.

CAI, W.Q.; LI, S.F.; MA, J.Y. Disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia x male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. **Aquaculture**, v. 229, p. 79-87, 2004.

CHAKRABORTY, S.B.; HANCZ, C. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. **Reviews in Aquaculture**, v. 3, p. 103-119, 2011.

CHANU, T.I.; SHARMA, A.; ROY, S.D.; CHAUDHURI, A.K.; BISWAS, P. Herbalbiomedicine –an alternative to synthetic chemicals in aquaculture feed in Asia. **World Aquaculture**, v. 43, p. 14–16, 2012.

CHEN, M.; LI, L.P.; WANG, R.; LIANG, W.W.; HUANG, Y.; LI, J.; LEI, A.Y.; HUANG, W.Y.; GAN, X. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China. **Veterinary Microbiology**, v. 159, p. 526-530, 2012.

CHU, C.; ZHANG, Q.Z.; LUO, F. 2010. Effect of twenty Chinese herbal medicines on killing trophonts, cysts and theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* in vitro. **Freshwater Fisheries**, v. 40, p. 55-60, 2010.

CITARASU, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. **Aquaculture International**, v. 18, p. 403–414, 2010.

COIMBRA, J.L.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S.; SOUZA, C.S.; RIBEIRO, F.L.B. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1209-1211, 2006.

DAIRIKI, J.K.; MAJOLO, C.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; OLIVEIRA, M.R.; MORAIS, I.S. 2013. **Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes**. Embrapa Circular Técnica nº 42. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100643/1/Circ-Tec-42.pdf>> Acesso em: 2 agosto 2017.

DAMIÃO, M.J.; GIANNOCCO, G.; GRESPAN, R.; SILVA, E.L.; DUARTE, J.S.; MACIEL, R.M.B.; YAMADA, A.N.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Ginger Essential oil ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 6, p. 959-965, 2013.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ JR., M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants

popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69–91, 2002.

DOTTA, G.; MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P.; PILATI, C.; BEZERRA, A.J.M.; MORÁN, R. Acute inflammatory response in Nile tilapia fed *Lactobacillus plantarum* in the diet. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 33, p. 239-246, 2011.

DÜGENCI, S.K.; ARDA, N.; CANDAN, A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 88, p. 99–106, 2003.

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

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. 2014. **2012 – Síntese da piscicultura de água doce – Planilha com dados por espécie**. Disponível em: < <http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Dados-aquic.-por-esp%C3%A9cie-2012.xlsx> >. Acesso em: 22 junho 2017.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. 2015. **2014 – Planilha: Dados de produção da piscicultura de água doce**. Disponível em: < http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Piscicultura_Estadual_2014_Cedap_2015.xlsx >. Acesso em: 21 junho 2017.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. 2016. **2015 – Planilha: Dados de produção da piscicultura de água doce**. Disponível em: < <http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Piscicultura-Estadual-2015-Cedap.xls> >. Acesso em: 21 junho 2017.

EVANS, J.J.; KLESIOUS, P.H.; GILBERT, P.M.; SHOEMAKER, C.A.; AL SARAWI, M.A.; LANDSBERG, J.; DUREMDEZ, R.; AL MARZOUK, A.; AL ZENKI, S. Characterization of b-haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 25, p. 505-513, 2002.

EVANS, J.J.; KLESIOUS, P.H.; PASNIK, D.J.; BOHNSACK, J.F. Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 5, p. 774-746, 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2005. Cultured Aquatic **Species Information Programme - *Oreochromis niloticus***. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en> Acesso em: 9 agosto 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production** – FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, 547. Roma: FAO, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/ba0056e/ba0056e.pdf>> Acesso em: 5 fevereiro 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. 2014. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>>. Acesso em: 24 junho 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. 2016a. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em: 21 junho 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. 2016b. **Fishery and Aquaculture Statistics 2014**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/yearbook/en>> Acesso em: 1 setembro 2017.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fisheries Global Information System (FIGIS)**. Roma: FAO, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/figis/>> en>. Acesso em: 22 junho 2017.

FERRI, M. G.; MENEZES, N. L.; MONTEIRO-SCANAVACCA, W. R. **Glossário Ilustrado de Botânica**. 1ed. São Paulo: Nobel, 1981. 197 p.

FIGUEIREDO, H.C.P.; CARNEIRO, D.O.; FARIA, F.C.; COSTA, G.M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 678-680, 2006.

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

FRANZ, C.; BASER, K.; WINDISCH, W.. Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 327–340, 2010

FU, C. ; CUI, Y. ; HUNG, S.S.O. ; ZHU, Z. Growth and feed utilization by F₄ human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. **Journal of Fish Biology**, v. 53, p. 115-129, 1998.

FU, Y.W.; WANG, B.; ZHANG, Q.Z.; XU, D.H.; LIN, D.J.; YANG, X.Y.; ZHU, S.Q.; PAN, J.Y.; DENG, Q.; LIU, Y.M.; ZHOU, S.Y. Combined effects of Chinese medicine feed and ginger extract bath on co-infection of *Ichthyophthirius multifiliis* and *Dactylogyrus ctenopharyngodonid* in grass carp. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 2017-2025, 2017.

GARCIA, P.; MAGALHÃES, A.R.M. Protocolo de identificação e quantificação de bucefalose (enfermidade laranja) em mexilhões *Perna perna*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, p. 11-19, 2008.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J. D.; RAMOS, F. Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: Health care impact. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, p. 28–44, 2014.

GENG, Y.; WANG, K.Y.; HUANG, X.L.; CHEN, D.F.; LI, C.W.; REN, S.Y.; LIAO, Y.T.; ZHOU, Z.Y.; LIU, Q.F.; DU, Z.J.; LAI, W.M. *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, p. 369–375, 2011.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproductibility in the hematology laboratory: the microhematocrit

determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.

GOVIND, P.; MADHURI, S.; MANDLOI, A. Immunostimulant effect of medicinal plants on fish. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, p. 112–114, 2012.

HAGHIGHI, M.; ROHANI, M.S. The effects of powdered ginger (*Zingiber officinale*) on the haematological and immunological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Medicinal Plant and Herbal Therapy Research**, v. 1, p. 8-12, 2013.

HANIFFA, M.A.; KAVITHA, K. Antibacterial activity of medicinal herbs against the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, n. 1, p. 205-211, 2012.

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

HASSANIN, M. E. S., HAKIM, Y; BADAWI, M.E.S. Dietary effect of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on growth performance, immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Abbassa International Journal for Aquaculture**, v. 7, n. 1, p. 35-52, 2014.

HASSON, K., FAN, Y., LINGSWEILLER, S., WEAVER, S., CHENG, J., VARNER, P. Streptococcosis in farmed *Litopenaeus vannamei*: a new emerging bacterial disease of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 86, p. 93–106, 2009.

HERNANDEZ, E.; FIGUEROA, J.; IREGUI, C.A. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* spp., farm: a case study. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, p. 247–252, 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**, v. 43, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf>. Acesso em: 23 junho 2017.

IMMANUEL, G.; UMA, R.P.; IYAPPARAJ, P.; CITARASU, T.; PUNITHA-PETER, S.M.; BABU, M.M.; PALAVESAM, A. Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 1462-1475, 2009.

ISHIKAWA, N.M., RANZANI-PAIVA, M.J.T., LOMBARDI, J.V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, p. 54-63, 2008.

JANTRAKAJORN, S.; MAISAK, H.; WONGTAVATCHAI, J. Comprehensive investigation of streptococcosis outbreaks in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and red tilapia, *Oreochromis* sp., of Thailand. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 45, p. 392-402, 2014.

JEENA, K.; LIJU, V.B.; KUTTAN, R. A preliminar 13-week oral toxicity study of ginger oil in male and female Wistar rats. **International Journal of Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 662-670, 2011

JEENA, K.; LIJU, V.B.; KUTTAN, R. Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of essential oil from ginger. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 51-62, 2013.

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, p. 51-58, 1993.

KANANI, H.G.; NOBAHAR, Z.; KAKOOLAKI, S.; JAFARIAN, H. Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p.481-490, 2014.

KAYANSAMRUJ, P.; PIRARAT, N.; KATAGIRI, T.; HIRONO, I.; RODKHUM, C. Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, p. 488-495, 2014.

KONE, M.; CISSE, M.; AFFORMOU, K.; SORIC, R.E.; FANTODJI, A.; MIRON, D.L. In vivo antiparasitic effects of an African's traditional plant *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1758) on fish louse *Argulus* spp. infesting the Nile tilapia males *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in fish farming. **Open Science Repository Veterinary Medicine**. Disponível em: <

KORNI, F.M.M.; KHALIL, F. Effect of ginger and its nanoparticles on growth performance, cognition capability, immunity and prevention of motile *Aeromonas* septicaemia in *Cyprinus carpio* fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. xxxx, p. 2017, in press.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDS, P.; BOULAMATIS, A. Antimicrobial activity of some plants extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Food Science and Technology**, London, v. 41, p.119-127, 2007.

KUBITZA, F. Tilápias na bola de cristal. **Panorama da Aquicultura**, v.17, n. 99, p. 14-21, 2007.

KUBITZA, F. O status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil. **Panorama da aquicultura**, v.21, n. 124, p.10-19, 2011.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Acqua & Imagem, 2000. 285p.

KUBITZA, L. M. M. *Streptococcus* versus tilápias: É preciso se antecipar ao problema. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, n.66, p. 33-36, 2001.

KUMAR, A.; RAMAN, R.P.; KUMAR, K.; PANDEY, P.K.; KUMAR, N.; MOHANTY, S.; KUMAR, A. In vitro and in vivo antiparasitic activity of azadirachtin against *Argulus* spp. in *Carassius auratus* (Linn. 1758). **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 1795-1800, 2011.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; GUZMÁN-MENDEZ, B.E.; LÓPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amstersdam, v. 216, n. 1-4, p. 193-201, 2003.

LEVY, G.; ZILBERG, D.; PALADINI, G.; FRIDMAN, S. Efficacy of ginger-based treatments against infection with *Gyrodactylus turnbulli* in the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). **Veterinary Parasitology**, v. 209, p. 235-241, 2015.

LI, Y.W.; LIU, L.; HUANG, P.R.; FANG, W.; LUO, Z.P.; PENG, H.L.; WANG, Y.X.; LI, A.X. Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Fish Diseases**, v. 37, p. 757-763, 2014.

LIJU, V.B.; JEENA, K.; KUTTAN, R. Gastroprotective activity of essential oils from turmeric and ginger. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 95-103, 2015.

LIMMA-NETTO, J.D.; SENA, A.C.; COPATTI, C.E. Essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosos* in the sedation, anesthesia and recovery of the tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, p.727-733, 2016.

LIN, D.J.; HUA, Y.N.; ZHANG, Q.Z.; XU, D.H.; FU, Y.W.; LIU, Y.M.; ZHOU, S.Y. Evaluation of medicated feeds with antiparasitical and immune-enhanced Chinese herbal medicines against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Parasitology Research**, v. 115, n. 6, p. 2473-2483, 2016.

LIU, C.T.; RAGHU, R.; LIN, S.H.; WANG, S.Y.; KUO, C.H. TSENG, Y.J.; SHEEN, L.Y. Metabolomics of ginger essential oils against alcoholic fatty liver in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 11231-11240, 2013.

LIU, L.; LI, Y.W.; HE, R.Z.; XIAO, X.X.; ZHANG, X.; SU, Y.L.; WANG, J., LI, A.X. Outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in barcoo grunter, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite), in an intensive fish farm in China. **Journal of Fish Diseases**, v. 37, p. 1067-1072, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.

LUSIASTUTI, A.M.; TEXTOR, M.; SEEGER, H.; AKINEDEN, Ö.; ZSCHÖCK, M. The occurrence of *Streptococcus agalactiae* sequence type 261 from fish disease outbreaks of tilapia *Oreochromis niloticus* in Indonesia. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 1260–1263, 2014.

MARTIN, C.; TEAI, T.; EGRETAUD, C.; LECCHINI, D.; LE PENNEC, M. In vitro anesthetic effects of the savage basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil on the fish *Stegastes nigricans*. **European Journal of Scientific Research**, v. 59, n. 1, p. 55–62, 2011.

MARTINS, M.L. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. In: **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004a. p. 357-370.

MARTINS, M.L. Manejo sanitário na piscicultura. In: **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004b. p. 323-332.

MATASYOH, L.G.; MATASYOH, J.C.; WACHIRA, F.N.; KINYUA, M.G.; MUIGAI, A.W.T; MUKIAMA, T.K. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.6, p.760-765, 2007.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 3. ed. ver. atual. Fortaleza: Ed. Universidade Federal do Ceará, 1998. 220p

MCLAFFERTY, F.W.; STAUFFER, D.B. **Registry of Mass Spectral Data**. 6. ed. New York: Wiley, 1994.

MEEPAGALA, K.M.; SCHRADER, K.K.; BURANDT, C.L. Antibacterial compounds from Rutaceae with activities against *Flavobacterium columnare* and *Streptococcus iniae*. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 2, p. 90-100, 2013.

MEURER, F.; HAYASHI, C. BOSCOLO, W.R.; SOARES, C.M. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo

(*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 566-573, 2002.

MIAN, G.F.; GODOY, D.T.; LEAL, C.A.G.; YUHARA, T.Y.; COSTA, G.M.; FIGUEIREDO, H.C.P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 180-183, 2009.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos cultivados. In - Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. **Special topics in tropical freshwater fish farming intensive**. TecArt editora. São Paulo, p. 343-383. 2004.

MUSA, N.; WEI, L.S.; HAMDAN, R.H.; LEONG, L.K.; WEE, W.; AMAL, M.N.; KUTTY, B.M.; ABDULLAH, S.Z. Streptococcosis in red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercial farms in Malaysia. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 630–632, 2009.

NWABUEZE, A.A. Antimicrobial action of epidermal mucus extract of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) juveniles-fed ginger inclusion in diet. **International Journal of Biology**, v. 6, n. 2, p. 42-48, 2014.

NYA, E.J.; AUSTIN, B. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, p. 971-977, 2009.

NOLASCO, F. **Deficiências nutricionais em manjeriço (*Ocimum spp.*), sob hidroponia**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 19p. (Monografia).

NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; LEITE, A.K.R.M.; FARIAS, V.M.; BRAGA, L.T.; LOPES, C.A.P. Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. **Ciência Animal**, v. 13, n. 1, p. 23-32, 2003.

NYA, E.J.; AUSTIN, B. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoes, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila*

infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 32, p. 971-977, 2009.

OIE – World Organisation for Animal Health. 2016. **The OIE strategy on antimicrobial resistance and the prudent use of antimicrobials**. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Portail AMR/EN_OIE-AMRstrategy.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Portail_AMR/EN_OIE-AMRstrategy.pdf)> Acesso em: 5 fevereiro 2017.

ORAFIDIYA, L.O.; AGBANI, E.O.; IWALEWA, E.O.; ADELUSOLA, K.A.; OYEDAPO, O.O. Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. **Phytomedicine**, v. 11, p. 71–76, 2004.

ORAFIDIYA, L.O.; OYEDELE, A.O.; SHITTU, A.O.; ELUJOBA, A.A. The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 177-183, 2001.

ORHAN, I.E. Pharmacognosy: Science of natural products in drug discovery. **Bioimpacts**, v. 4, n. 3, p. 109-110, 2014.

PACHECO-SILVA, E.; SOUZA, J.R.; CALDAS, E.D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 111-122, 2014.

PÁDUA, S. B.; MENEZES FILHO, R. N.; CRUZ, C. Alevinos saudáveis: o ponto de partida para uma produção estável. **Panorama da Aquicultura**, v. 22, n. 134, p. 30-37, 2012.

PATON, A.; HARLEY, R. M.; HARLEY, M. M. *Ocimum*: An overview of classification and relationships. In: HOLM, Y.; HILTUNEN, R. (ed.) ***Ocimum: medicinal and aromatics plants – industrial profiles***. Ed. Hardman, 1999. p.1-38.

PAULA-FREIRE, L.I.G.; ANDERSEN, M.L.; MOLSKA, A.G.R.; KÖHN, D.O.; CARLINI, E.L.A. Evaluation of the antinociceptive activity of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) essential oil and its isolated active principles in mice. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1220-1224, 2013.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. Bacterioses. In: **Doenças de Peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá, 2008. p. 165-220.

PEREIRA, U.P.; MIAN, G.F.; OLIVEIRA, I.C.M.; BENCHETRIT, L.C.; COSTA, G.M.; FIGUEIREDO, H.C.P. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 186-192, 2010.

PILARSKI, F.; ROSSINI, A.J.; CECCARELLI, P.S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 409-414, 2008.

PIRES, A.F.P.; MADEIRA, S.V.F.; SOARES, P.M.G.; MONTENEGRO, C.M.; SOUZA, E.P.; RESENDE, A.C.; MOURA, R.S.; ASSREUY, A.M.S.; CRIDDLE, D.N. The role of endothelium in the vasorelaxant effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* in aorta and mesenteric vascular bed of rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 90, p. 1380-1385, 2012.

PLUMB, J.A.; SCHACHTE, J.H.; GAINES, J.L. *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.103, p. 358-361, 1974.

PRABHU, K.S.; LOBO, R.; SHIRWAIKAR, A.A.; SHIRWAIKAR, A. *Ocimum gratissimum*: A review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 1, p. 1-15, 2009.

PRIDGEON, J.W.; KLESIUS, P.H. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* as potential vaccines by selecting for resistance to sparflaxacin. **Vaccine**, v. 31, n. 24, p. 2705-2712, 2013.

PUNITHA, S.M.J.; BABU, M.M.; SIVARAM, V.; SHANKAR, V.S.; DHAS, S.A.; MAHESH, T.C.; IMMANUEL, G.; CITARASU, T. Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in Grouper *Epinephelus tauvina* juvenile against *Vibrio*

harveyi infection. **Aquaculture International**, London, v. 16, p. 511-523, 2008.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: Eduem, 2013. 140 p.

RASHEED, V.; PLUMB, J. Pathogenicity of a non-hemolytic group B *Streptococcus* sp. In gulf killifish (*Fundulus grandis* Baird and Girard). **Aquaculture**, v. 37, p. 97–105, 1984.

REINCHENBACH-KLINKE, H.H. **Enfermedades de los peces**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1982. 507 p.

RIBEIRO, A.S.; DOS S. BATISTA, E.; DAIRIKI, J.K.; CHAVES, F.C.M.; INOUE, L.A.K.A. Anesthetic properties of *Ocimum gratissimum* essential oil for juvenile matrinxã. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 38, p. 1–7, 2016.

ROBERTS, R. J. The Bacteriology of Teleosts. In: ROBERTS, R. J. **Fish Pathology**. 4. ed. Edinburgh: W. B. Saunders, 2012. p. 339-382.t

ROBINSON, J.A.; MEYER, F.P. Streptococcal fish pathogen. **Journal of Bacteriology**, v. 92, p. 512, 1966.

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

SALVADOR, R.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; LEONHADT, J.H.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; DIAS, J.A. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1374–1378, 2005.

SCHRAG, S.; GORWITZ, R.; FULTZ-BUTTZ, K.; SCHUCHAT, A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 51, p. 1-22, 2002.

SCHWAIGER, J., WANDE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathologic indicators to evaluate

contaminant related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, p. 75–86, 1997.

SHAKYA, S.R. Medicinal uses of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) improves growth and enhances immunity in aquaculture. **International Journal of Chemical Studies**, v. 3, n. 2, p. 83-87, 2015.

SHINN, A.J.; PRATOOMYOT, J.; BRON, J.; PALADINI, G.; BROOKER, E.; BROOKER, A. Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. **Global Aquaculture Advocate**, v. 6, p. 58-61, 2015.

SILVA, L. L.; DA SILVA, D.T.; GARLET, Q.I.; CUNHA, M.A.; MALLMANN, C.A.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S.J.; PEREIRA, A.M.S.; HEINZMANN, B.M. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, p. 443–451, 2013.

SILVA, L.L.; GARLET, Q.I.; KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA, T.A.; BARCELLOS, L.J.G.; BALDISSEROTTO, B.; PEREIRA, A.M.S.; HEINZMANN, B.M. Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 215-223, 2015.

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

SILVEIRA, F.S.; SILVA, F.M.; CASACA, J.M. **Desempenho catarinense na piscicultura de água doce**. 2015. Disponível em: <<http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Desempenho-da-Piscicultura-Catarinense-2015.pdf>> Acesso em: 22 junho 2017.

SINDAN - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal. **Compêndio de Produtos Veterinários**. Disponível em: <<http://www.cpvps.com.br/cpvps/pesquisar.aspx>>. Acesso em: 25 Agosto 2017.

SIVARAM, V.; BABU, M.M.; IMMANUEL, G.; MURUGADASS, S.; CITARASU, T.; MARIAN, M.P. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. **Aquaculture**, v. 237, p. 9-20, 2004.

SØRENSEN, U.B., POULSEN, K., GHEZZO, C., MARGARIT, I., KILIAN, M. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. **mBio**, v. 1, n. 3, p. 1-9, 2010.

SUANYUK, N.; KONG, F.; KO, D.; GILBERT, G.L.; SUPAMATTAYA, K. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—relationship to human isolates? **Aquaculture**, v. 284, p. 35–40, 2008.

SUTILI, F.J.; GATLIN, D.M.; ROSSI JR., W.; HEINZMANN, B.M.; BALDISEROTTO, B. In vitro effects of plant essential oils on non-specific immune parameters of red drum, *Sciaenops ocellatus* L. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, n. 6, p.1113-1120, 2016.

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

TAKAHASHI, N.S. **Nutrição de peixes**. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultores e Pesqueiros, 2011. Disponível em: < <http://www.abrappesq.com.br/materias.htm> >. Acesso em: 23 junho 2017.

TALPUR, A.D.; IKHWANUDDIN, M.; BOLONG, A. M. A. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, v. 400-401, p. 46-52, 2013.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**. doi: 10.1007/s12639-017-0938-y

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA FILHO, R.R.; MORGADO-DIAZ, J.A.; MAZA, P.K.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; SALES, D. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99-105, 2006.

WANG, K.Y.; CHEN, D.F.; HUANG, L.Y.; LIAN, H.; WANG, J.; XIAO, D. Isolation and characterization of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in China. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 317–323, 2013.

WATERMAN, P. G. The chemistry of volatile oils. In: HAY, R. K. M., WATERMAN, P. G. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Essex: Longman Group, 1993. p.47-61.

WEIBEL, E.R. Principles and methods for morphometrical study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation**, v. 12, p. 131-155, 1963.

WEICHSELBAUM, C.T.E. An accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 16, n. 3, p. 40-49, 1946.

WORLD BANK GROUP. **Reducing disease risks in aquaculture**. World Bank Report #88257-GLB, 2014. Disponível em: <<https://openknowledge.worldbank.org/bitstream/handle/10986/20031/882570REPLACEM00NAME0Reantaso0Melba.pdf>> Acesso em: 12 agosto 2017.

WU, Z.F.; ZHU, B.; WANG, Y.; LU, C.; WANG, G.X. In vivo evaluation of anthelmintic potential of medicinal plant extract against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). **Parasitology Research**, v. 108, p. 1557-1563, 2011.

YE, X.; LI, J.; LU, M.; DENG, G.; JIANG, X.; TIAN, Y.; QUAN, Y.; JIAN, Q. Identification and molecular typing of *Streptococcus*

agalactiae isolated from pond-cultured tilapia in China. **Fisheries Science**, v. 77, p. 623–632, 2011.

YILDIRIM, M.; LIM, C.; WAN, P.; KLESIUS, P.H. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing grade levels of gossypol-acetic acid. **Aquaculture**, v. 219, p. 751-768, 2003.

YILMAZ, S.; ERGÜN, S. Effects of garlic and ginger oils on hematological and biochemical variables of sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 24, p. 219-224, 2012.

YOUSEFIAN, M.; AMIRI, M.S. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 25, p. 7313-7318, 2009.

ZAMIN, M. An analgesic and hepatoprotective plant: *Ocimum gratissimum*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 20, p. 954-955, 2011.

ZANIBONI FILHO, E. Piscicultura das espécies exóticas de água doce. In: POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. (Eds.). **Aquicultura: Experiências Brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2004. p. 309-336.

ZAPPULLI, V., MAZZARIOL, S., CAVICCHIOLO, L., PETTERINO, C., BARGELLONI, L., CASTAGNARO, M. Fatal necrotizing fasciitis and myositis in a captive common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) associated with *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 617–622, 2005.

ZHANG, Q.; XU, D.H.; KLESIUS, P.H. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 45-53, 2013.

ZHENG, Z.L.; TAN, J.Y.W.; LIU, H.Y.; ZHOU, X.H.; XIANG, X.; WANG, K.Y. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, p. 214-218, 2009.

ANEXO I – Artigo referente ao Capítulo I, publicado no periódico “Aquaculture”

Aquaculture 468 (2017) 235–243



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture



Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*



Aline Brum^{a,*}, Scheila Anelise Pereira^a, Marco Shizuo Owatari^a, Edsandra Campos Chagas^b, Francisco Célio Maia Chaves^b, José Luiz Pedreira Mourião^a, Maurício Laterça Martins^a

^a AQUOS – Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil
^b EMBRAPA Western Amazonia, Rod. AM 010, km 29, Zona Rural, 69010-970 Manaus, AM, Brazil

article info

Article history:

Received 25 July 2016
 Received in revised form 4 October 2016
 Accepted 10 October 2016
 Available online 12 October 2016

Keywords:

Feed efficiency
 Hematology
Ocimum gratissimum
 Phagocytosis
 Dietary supplementation
Zingiber officinale

abstract

Nile tilapia is the most farmed freshwater fish, however disease outbreaks are the main cause of losses in the production. Active compounds from plants are an alternative to synthetic chemicals to enhance growth and disease resistance. This study aimed to verify the effects of dietary supplementation with essential oils of clove basil (*Ocimum gratissimum*) and ginger (*Zingiber officinale*) on tilapia, regarding growth, hemato-immunological parameters and survival to challenge with *S. agalactiae*. Juveniles fed for 55 days with supplemented diets (0.5%, 1.0% and 1.5%) were challenged by gavage with *S. agalactiae* and monitored for 10 days. At 35 and 55 days of supplementation and 10 days after infection, blood was collected for hemato-immunological assays. For growth parameters, fish were weighed every 10 days. Clove basil at 0.5% significantly improved ($p < 0.05$) feed conversion ratio (1.34 ± 0.13 in control, with final weight of 19.25 ± 2.38). At 55 days, neutrophils were higher in fish fed ginger 1.0% ($p < 0.05$) compared to ginger 0.5% and 1.5%. Ten days after infection, there were significant differences in thrombocytes, total leukocytes, lymphocytes and neutrophils. Except for 1.5% ginger, all supplemented diets showed increased phagocytic activity ($p < 0.05$). After challenge, the only group with 100% relative survival was 0.5% ginger, while control had 2.86% mortality. Dietary supplementation with essential oils was useful for improving growth, immune responses and disease resistance.

Statement of relevance: This study reports the use of natural compounds for prophylactic purposes as an alternative to chemical antibiotics, whose hazardous consequences regarding environmental and health questions have been reported. *Streptococcus agalactiae* is a highly pathogenic and potentially zoonotic bacteria affecting farmed tilapia. The tested compounds proved to enhance the growth and immune response of fish against *S. agalactiae*.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) is one of the most cultured and traded freshwater fish, being farmed in N 135 countries (FAO, 2014). However, bacterial infections have been causing massive mortalities in farmed tilapia. The infections by *Streptococcus*, mainly represented by *S. agalactiae* and *S. iniae*, are the main cause of losses in tilapia farming. Seventy percent of all the isolates from farmed tilapia were identified as *Streptococcus*, with 82% of these corresponding to *S. agalactiae* (MSD Animal Health, 2012). *S. agalactiae* is known for causing infection in humans and cattle, and recently has emerged as a fish pathogen with zoonotic potential (Evans et al., 2009). *S. agalactiae* causes diseases in other fish species, but, in particular, Nile tilapia is highly susceptible

(Li et al., 2014). The clinical signs include septicemia, exophthalmia, corneal opacity, melanosis, erratic swimming, ascites and hemorrhage in the internal organs (Chen et al., 2012).

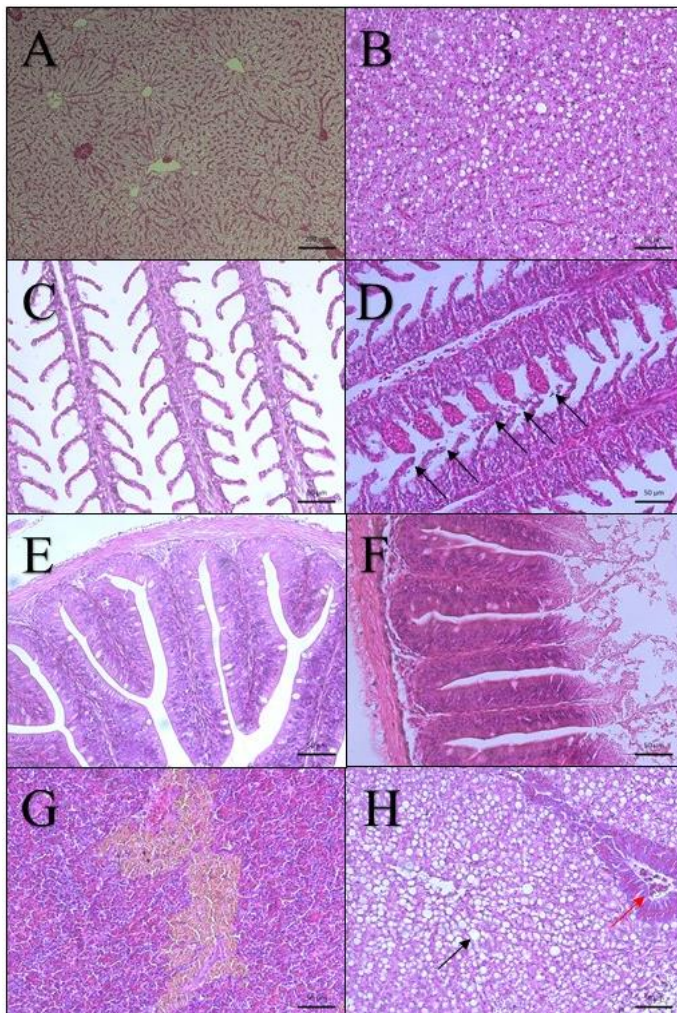
Effective commercial vaccines against *S. agalactiae* are available, however, vaccination in early stages of life is difficult and tilapia is susceptible to many other diseases, such as those caused by *Franscella*, *Flavobacterium*, *Trichodina*, *Dactylogyrus*, *Edwardsiella*, *Nocardia*, *Iridovirus*, *Saprolegnia* and *Branchiomyces* (Absali and Mohamad, 2010; MSD Animal Health, 2012).

Regarding these questions, many studies have focused on the prophylactic use of natural products to improve disease resistance in fish. Recently, there has been a trend in the use of plant extracts for improving immune responses and disease resistance in fish (Bullon et al., 2015). The main advantages are reduced toxicity, reduced aquatic contamination, less toxic waste in animals destined to human feeding, reduced risk of selecting resistant pathogens and, in general, less financial cost to the farmers compared to synthetic chemicals (Coimbra et al., 2006).

* Corresponding author at: AQUOS – Aquatic Organism Health Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

E-mail address: aline.brums@posgrad.ufsc.br (A. Brum).

ANEXO II - Histologia de órgãos internos de tilápias-do-nylo suplementadas com óleos essenciais e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.



(A) Tecido hepático de peixe do controle aos 55 dias de suplementação, apresentando manutenção do aspecto cordal dos sinusoides em boa parte do órgão. Barra: 200 μ m. (B) Tecido hepático de peixe do controle dez dias após desafio com *Streptococcus agalactiae*, apresentando perda do aspecto cordal, microesteatose e núcleos picnóticos. Barra: 50 μ m. (C) Tecido

branquial de peixe tratado com óleo de manjerição a 1,0%, dez dias após a infecção, apresentando lamelas secundárias com aspecto normal. Barra: 50 μm . (D) Tecido branquial de peixe do controle, dez dias após a infecção, apresentando telangiectasia (setas). Barra: 50 μm . (E) Vilos intestinais de peixes tratados com óleo de manjerição a 1,0%, dez dias após a infecção, apresentando aspecto normal. Barra: 50 μm . (F) Vilos intestinais de peixes tratados com óleo de gengibre a 1,5%, aos 55 dias de suplementação, apresentando necrose nas extremidades. Barra: 50 μm . (G) Centro de melanomacrófagos em tecido esplênico de peixe tratado com óleo de manjerição a 1,0%. Barra: 50 μm . (H) Tecido hepático de peixe do controle aos 55 dias, apresentando microesteatose e hepatócitos com aspecto balonoso (seta preta), além de congestão no pâncreas (seta vermelha). Barra: 50 μm . Coloração: HH & E.