

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

**EFEITOS IN VITRO E IN VIVO EM TAMBAQUI DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia*
sidoides E *Cymbopogon citratus***

ALTIERY FELIX E SILVA

SALVADOR - BAHIA
FEVEREIRO- 2022



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

**EFEITOS IN VITRO E IN VIVO EM TAMBAQUI DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia*
sidoides E *Cymbopogon citratus***

ALTIERY FELIX E SILVA

SALVADOR - BAHIA
FEVEREIRO - 2022

ALTIERY FELIX E SILVA

**EFEITOS IN VITRO E IN VIVO EM TAMBAQUI DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia
sidoides* E *Cymbopogon citratus***

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

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Copatti

**SALVADOR - BA
FEVEREIRO – 2022**

Silva, Altiery Felix e.
Efeitos in vitro e in vivo em tabaqui dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Cymbopogon citratus* /
Altiery Felix e Silva. - 2022.
96 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Copatti.
Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Salvador, 2022.

1. Zootecnia. 2. Tabaqui (Peixe). 3. Essências e óleos essenciais. 4. Antibióticos na nutrição animal.
I. Copatti, Carlos Eduardo. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia.
III. Título.

CDD - 639.311
CDU - 639.31

**EFEITOS IN VITRO E IN VIVO EM TAMBAQUI DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Lippia sidoides E *Cymbopogon citratus***

Altiery Felix e Silva

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

Salvador, 23 de fevereiro de 2022

Comissão examinadora:



Dr. Carlos Eduardo Copatti
UFBA
Orientador / Presidente

Documento assinado digitalmente

gov.br

LUIZ VITOR OLIVEIRA VIDAL

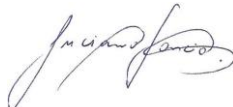
Data: 02/03/2022 18:35:52-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. Luiz Vitor de Oliveira Vidal
UFBA



Dr. José Fernando Bibiano Melo
UNIVASF



Dr. Luciano de Oliveira Garcia
FURG



Dr. Antônio Cleber da Silva Camargo
UNIPAMPA

Dedicatória

Dedico esta obra ao meu pai Almir Felix Gonçalves (in memoria), por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

De início quero agradecer a Deus por tudo que ele tem proporcionado a mim e a toda minha família.

Agradecer a minha mãe Maria Daguima da Silva pelo apoio nos mais diversos momentos.

Agradecer ao apoio da minha esposa Jessyca Samara que compartilha comigo as adversidades enfrentadas diariamente.

Agradecer aos meus filhos Brayan Felix e Gael Almir Felix, pelo amor e compreensão das diversas vezes que estive ausente.

Agradeço a toda equipe dos laboratórios de Aquicultura da UNIVASF, pelo apoio nas diversas fases de experimentação.

Agradeço à toda a equipe do laboratório LEFFA da UFBA pelo apoio.

Agradeço a todos os professores que participaram direta e indiretamente da minha formação acadêmica.

Agradeço ao professor José Fernando Bibiano Melo, pela parceria na condução destes estudos.

Agradeço ao professor Carlos Eduardo Copatti, pela oportunidade da realização deste doutorado.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Atividade antimicrobiana e sinérgica com florfenicol dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Cymbopogon citratus* contra *Aeromonas hydrophila*, um importante patógeno para a aquicultura

Página

Figura 1. Concentração mínima de bactérias (MBC) dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> (OELS) e <i>Cymbopogon citratus</i> (OECC) contra <i>Aeromonas hydrophila</i> (n = 6).....	76
--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Atividade antimicrobiana e sinérgica com florfenicol dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Cymbopogon citratus* contra *Aeromonas hydrophila*, um importante patógeno para a aquicultura

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> . TR = Taxa de retenção. IRL = índice de retenção na literatura (Adams, 2009; NIST, 2010).....	32
Tabela 2. Composição química do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> . TR = Taxa de retenção. IRL = índice de retenção na literatura (Adams, 2009; NIST, 2010).....	34
Tabela 3. Classificação dos isolados de <i>Aeromonas hydrophila</i> para produção de biofilme.....	37
Tabela 4. Interferência dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> (OELS) e <i>Cymbopogon citratus</i> (OECC) na formação de biofilme em <i>Aeromonas hydrophila</i> isolados que foram previamente classificados como fracos produtores de biofilme. OD = densidade óptica.....	38
Tabela 5. Atividade dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> (OELS) e <i>Cymbopogon citratus</i> (OECC) no biofilme consolidado de <i>Aeromonas hydrophila</i> . OD = densidade óptica.....	39
Tabela 6. Índice de fração inibitória (IFI) usada para determinar o efeito sinérgico entre óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> (OELS) e <i>Cymbopogon citratus</i> (OECC) e florfenicol em <i>Aeromonas hydrophila</i> . CMB = Concentração mínima de bactérias.....	40

Capítulo 2

Óleo essencial de *Lippia sidoides* na dieta de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*): desempenho, variáveis hematológicas e bioquímicas e enzimas intestinais

Tabela 1. Composição das dietas experimentais fornecidas ao tambaqui.....	68
Tabela 2. Desempenho de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de <i>L. sidoides</i> (OELS).....	72
Tabela 3. Variáveis hematológicas de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de <i>L. sidoides</i> (OELS).....	74
Tabela 4. Variáveis metabólicas de juvenis de tambaqui alimentados com dietas suplementadas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de <i>L. sidoides</i> (OELS).....	75
Tabela 5. Atividade das proteínas intestinais (UI mg protein ⁻¹) de juvenis de tambaqui alimentados com dietas suplementadas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de <i>L. sidoides</i> (OELS).....	76

SUMÁRIO

	Página
Introdução geral.....	10
Referências.....	14
Capítulo 1.....	19
Capítulo 2.....	60
Considerações finais e implicações.....	94

INTRODUÇÃO GERAL

A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) relata que a produção aquícola em cativeiro no mundo foi de 114,5 milhões de toneladas em 2018, gerando uma receita de US\$ 263,6 bilhões, sendo que a aquicultura interior (rios, lagos e fazendas de peixes) produziu 51,3 milhões de toneladas de animais aquáticos, respondendo por 62,5% da produção mundial de peixes para alimentos (FAO, 2020). Este aumento de produção é justificado pelo maior adensamento destes animais nos sistemas de produção, acompanhado por dietas que proporcionam uma maior eficiência alimentar e saúde aos animais.

O aumento na produção de peixes é justificado pela otimização em vários setores no sistema de produção. No entanto, no ciclo de produção, diversos fatores como transporte, manejo inadequado, má qualidade de água e alimentação de baixa qualidade nutricional causam estresse o que pode favorecer ao surgimento de doenças infecciosas que influenciam diretamente na saúde e no desempenho dos peixes (GAO et al., 2012; ZAGMUTT et al., 2013), as quais são responsáveis por grandes prejuízos econômicos na piscicultura. Neste sentido, a melhora na nutrição de peixes pode ser obtida a partir do uso de óleos essenciais na dieta.

Com a intensificação da piscicultura, o uso de aditivos como antibióticos sintéticos, quimioterápicos e vacinas tem sido utilizado nos sistemas de produção com intuito de prevenir a ação de agentes prejudiciais (HARIKRISHNAN et al., 2011). Contudo, o uso indiscriminado destes aditivos

contribui para o aumento dos custos de produção, facilita o prenúncio de situações indesejáveis, como bioacumulação dos resíduos de antibióticos nos peixes (YU-WEN, 2009; HARIKRISHNAN et al., 2011). Além disso, antibióticos sintéticos ainda podem ocasionar bactérias resistentes devido a disseminação de genes de resistência (BURRIDGE et al., 2010; NUNES et al., 2012).

As plantas produzem inúmeros fitoquímicos ou metabólitos secundários que não parecem ter relação direta com o crescimento e desenvolvimento vegetal, mas desempenham vantagens como defesa contra patógenos e herbivoria, atração de polinizadores, tolerância a temperaturas extremas e processos de adaptação ao estresse hídrico ou deficiência de nutrientes e minerais do solo (HAYOUNI et al., 2008; ANDRADE et al., 2014). Os óleos essenciais (OE) são utilizados na piscicultura no combate aos micro-organismos na forma de banho ou incorporados na alimentação (SACCOL et al. 2013; SUTILI et al. 2014). Estes óleos essenciais são uma mistura de compostos complexos, voláteis e de baixo peso molecular, sendo geralmente odoríferos, líquidos e em sua maioria constituída por moléculas terpênicas (MORAIS, 2009). Eles que podem ser extraídos de diversas partes das plantas, como raízes, sementes, flores, frutos, ou até mesmo da planta inteira. São formados por complexas misturas naturais e, em geral, contém de 20 a 60 compostos em diferentes concentrações (BAKKALI et al., 2008).

O uso de óleos essenciais é uma alternativa aos antibióticos sintéticos convencionais, devido ao potencial de seus princípios ativos e pela baixa toxicidade de suas moléculas ao meio ambiente (SACCOL et al., 2013; SUTILI et al., 2014). O uso de aditivos sintéticos pode causar alterações no equilíbrio ambiental e nas defesas imunológicas dos peixes (DAWOOD et al., 2018). O uso

de antibióticos pode não apenas selecionar bactérias mais resistentes a tais compostos, como também eliminar bactérias úteis (microbiota intestinal que contribui na melhora da absorção de nutrientes). Os OEs conseguem penetrar na barreira celular e na membrana citoplasmática de microrganismos, rompendo a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios (BAKKALI et al., 2008). Desta forma, aditivos naturais de origem vegetal, como OEs, têm chamado a atenção dos piscicultores, uma vez que tais substâncias têm demonstrado melhorar o desempenho de crescimento, a eficiência alimentar, a digestibilidade, a absorção de nutrientes e a saúde em peixes (SACCOOL et al., 2013; CHUNG et al., 2020; DE SOUZA et al., 2020).

O capim-limão (*Cymbopogon citratus*) é uma planta da família Poaceae aromática e o seu OE é composto majoritariamente por citral, que possui propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias, antissépticas, antimicrobianas e antifúngicas (AL-SAGHEER et al., 2017). Citral (mistura de isômeros geranial (α -citral) e neral (β -citral)) em combinação com outros componentes já demonstrou contribuir com a melhor performance de crescimento de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com OEs de *A. triphylla* (2,0 mL kg dieta⁻¹; ~40 % de citral) (DE SOUZA et al., 2020) e *Cymbopogon flexuosus* (2,0 mL kg dieta⁻¹; 89,21 % de citral) (SOUZA et al., 2020). Além disso, citral pode suprimir o estresse oxidativo, possivelmente por meio da indução das proteínas antioxidantes endógenas (ZEPPEFELD et al., 2017).

O OE de *Lippia sidoides* Cham. (syn. *L. origanoides*), planta endêmica do nordeste brasileiro conhecida popularmente como alecrim-pimenta. Seus principais constituintes geralmente são timol e carvacrol, sendo que o interesse para suas aplicabilidades biológicas se deve ao seu uso na medicina popular, o

qual é bem conhecido no tratamento antifúngico, antisséptico e contra infecções (DOS SANTOS et al., 2015). O uso de OEs de três espécies de *Lippia* spp. em *Aeromonas hydrophila* demonstram alta eficiência antibacteriana (MAJOLO et al., 2017). O uso de carvacrol em combinação com timol atuou como promotor de crescimento em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) devido suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas e de reforço no sistema imune (ZHENG et al., 2009; GIANNENAS et al., 2012), o que pode contribuir com a melhora dos ganhos de crescimento em peixes. O aumento da atividade da lisozima do plasma foi observado com adição de OE de orégano (carvacrol como um dos compostos majoritários) em truta arco-íris e carpa comum (*Cyprinus carpio*) (DILER et al., 2017; ZHANG et al., 2020).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a espécie nativa mais cultivada no Brasil (18,20%), com uma produção de 101,10 mil toneladas em 2020 (IBGE, 2020). Sua produção aquícola de tambaqui aumentou de 13 mil toneladas em 2000 para 142 mil toneladas em 2016 (WOYNÁROVICH & ANROOY, 2019). Seu sucesso se deve a diferentes fatores. Ele apresenta excelente qualidade de filé e desempenho reprodutivo que possibilitam sua produção econômica e também apresenta aproveitamento de alimentos de origem animal ou vegetal, fácil adaptação a dieta fornecida, rusticidade e resistência a hipóxia (AFFONSO et al., 2002; ARAUJO-LIMA & GOMES, 2005). Por estes fatores, pode ser considerado uma excelente alternativa para a piscicultura no Brasil.

Os objetivos deste estudo foram 1) identificar os compostos dos OE de *Lippia sidoides* (sin. *Lippia organoides*) e *Cymbopogon citratus*, bem como avaliar seus efeitos *in vitro* na atividade antibacteriana, antibiofilme e, o efeito sinérgico com florfenicol contra *A. hydrophila* e 2) avaliar o efeito da

suplementação dietética de OE de *Lippia sidoides* em relação ao desempenho de crescimento, variáveis hematológicas e bioquímicas e enzimas digestivas em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

REFERÊNCIAS

AFFONSO, E.G.; POLEZ, V.P.L.; CORRÊA, C.F.; MAZON, A.F.; ARAÚJO, M.R.R.; MORAES, G.; RANTIN, F.T. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 133, p. 375–382, 2002.

AL-SAGHEER, A.A., MAHMOUD, H.K., REDA, F.M., MAHGOUB, S.A., AYYAT, M.S. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, p. 1006–1014, 2018.

ANDRADE, B.F.M.T.; BARBOSA, L.N.; PROBST, I.S.; FERNANDES JUNIOR, A. Antimicrobial activity of essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, p. 34–40, 2014

ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M., GOMES, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. In: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (Eds.), 2nd ed. UFSM, Santa Maria, p. 67–104, 2005.

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

BURRIDGE, L.; WEIS, J. S.; CABELLO, F.; PIZARRO, J.; BOSTICK, K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v. 306, p. 7–23, 2010.

CHUNG, S.; LEMOS, C.H.P.; TEIXEIRA, D.V.; FORTES-SILVA, R.; COPATTI,

C.E. Essential oil from *Ocimum basilicum* improves growth performance and does not alter biochemical variables related to stress in pirarucu (*Arapaima gigas*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, p. e20181374, 2020

DAWOOD, M.A.O.; KOSHIO, S.; ESTEBAN, M.A. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: A review. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, p. 950–974, 2018.

DE SOUZA, R.C.; BALDISSEROTTO, B.; MELO, J.F.B.; DA COSTA, M.M.; DE SOUZA, E.M.; COPATTI, C.E. Dietary *Aloysia triphylla* essential oil on growth performance and biochemical and haematological variables in Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 519, p. 734913, 2020.

DILER, O.; GORMEZ, O.; DILER, I.; METIN, S. 2016. Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, v. 23, p. 844–851.

DOS SANTOS, C.P., DE OLIVEIRA, T.C., PINTO, J.A.O., FONTES, S.S., CRUZ, E.M.O., ARRIGONI-BLANK, M.F., BLANK, A.F. Chemical diversity and influence of plant age on the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. germplasm. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 416–421, 2015.

FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

GAO, J.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; MAMAUAG, R.E.P.; HAN, Y. Effects of dietary oxidized fish oil with vitamin E supplementation on growth performance and reduction of lipid peroxidation in tissues and blood of red sea bream *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 356, p. 73–79, 2012.

GIANNENAS, I.; TRIANTAFILLOU, E.; STAVRAKAKIS, S.; MARGARONI, M.; MAVRIDIS, S.; STEINER, T.; KARAGOUNI, E. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on

performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 350, 26–32, 2012.

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

HAYOUNI, E.A.; CHRAIF, I.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; LEVEAU, J.Y.; MOHAMMED, H.; HAMDY, M. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 242–251, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020. Produção da Pecuária Municipal 2020, IBGE: Rio de Janeiro. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2020_v48_br_informativo.pdf

MAJOLO, C.; DA ROCHA, S.I.B.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C. M.; BIZZO, H.R. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 2380–2387, 2017.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050–4063, 2009.

NUNES, J.O.; BERTECHINI, A.G.; BRITO, J.A.; FASSANI, E.J.; MESQUITA, F.R.; MAKIYAMA, L.; MENEGHETTI, C. Evaluation of the probiotic (*Bacillus subtilis* C-3102) as additive to improve performance in broiler chicken diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 2374–2378, 2012.

SACCOL, E.M.H.; UCZAY, J.; PÊS, T.S.; FINAMOR, I.A.; OURIQUE, G.M.; RIFFEL, A.P.K.; SCHMIDT, D.; CARON, B.O.; HEINZMAN, B.M.; LIESURY, S.F.;

LAZZARI, R.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M.A. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416–417, p. 244–254, 2013.

SOUZA, E.M. de; DE SOUZA, R.C.; MELO, J.F.B.; DA COSTA, M.M.; SOUZA, S.A.; SOUZA, A.M.; COPATTI, C.E. *Cymbopogon flexuosus* essential oil as an additive improves growth, biochemical and physiological responses and survival against *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, p. e20190140, 2020.

SUTILI, F.J.; KREUTZ, L.C.; NORO, M.; GRESSLER, L.T.; HEINZMANN, B.M.; VARGAS, A.C.; BALDISSEROTTO, B. The use of eugenol against *Aeromonas hydrophila* and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 157, n. 3–4, p. 142–148, 2014.

WOYNÁROVICH, A., VAN ANROOY, R. Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 624. Rome, FAO. 132 pp. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2019.

YU-WEN. The benefits of oregano essential oil for aquaculture production. **International Aquafeed**, v. 4, p. 16–19, 2009.

ZAGMUTT, F.J.; SEMPIER, S.H.; HANSON, T.R. Disease spread models to estimate highly uncertain emerging diseases losses for animal agriculture insurance policies: An application to the U.S. farm-raised catfish industry, **Risk Analysis**, v. 33, p. 1924–1937, 2013.

ZEPPENFELD; C.C.; SACCOL; E.M.H.; PÊS; T.S.; SALBEGO; J.; KOAKOSKI; G.; SANTOS; A.C. DOS; HEINZMANN; B.M.; CUNHA; M.A.; BARCELLOS; L.J.G.; PAVANATO; M.A.; CARON; B.O.; BALDISSEROTTO B. *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen* – Stress and antioxidant

parameters. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, p. 1362–1367, 2017.

ZHANG, R.; WANG, X.W.; LIU, L.L.; CAO, Y.C.; ZHU, H. Dietary oregano essential oil improved the immune response, activity of digestive enzymes, and intestinal microbiota of the koi carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 518, p. 734–781, 2020.

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.

CAPÍTULO 1

Atividade antimicrobiana e sinérgica com florfenicol dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Cymbopogon citratus* contra *Aeromonas hydrophila*, um importante patógeno para a aquicultura

Publicado em Journal of Applied Microbiology

DOI: 10.1111/jam.15336

Atividade antimicrobiana e sinérgica com florfenicol dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Cymbopogon citratus* contra *Aeromonas hydrophila*, um importante patógeno para a aquicultura

RESUMO

Aeromonas hydrophila é uma bactéria oportunista, com grande capacidade de produção de biofilme, que pode causar danos severos na aquicultura. O objetivo deste estudo foi identificar os compostos dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (OELS) e *Cymbopogon citratus* (OECC), bem como avaliar sua ação biocida, antibiofilme e sinérgica com o antibiótico florfenicol contra *A. hydrophila*. A atividade antimicrobiana de OELS e OECC foi verificada pela concentração bactericida mínima e pela ação contra a formação de biofilme e biofilme consolidado. A atividade sinérgica de OELS e OECC com florfenicol foi realizada pela técnica de checkerboard. O principal componente de OELS e OECC foi carvacrol (44,50%) e α -citral (73,56%), respectivamente. Ambos os óleos essenciais mostraram fraca atividade inibitória ($\geq 3.125,00 \mu\text{g mL}^{-1}$). Dois isolados bacterianos apresentaram capacidade de produzir biofilme. A classificação para OELS e OECC foi de não produtor e fraco produtor de biofilme para cada isolado. Foi verificado efeito bactericida no biofilme previamente consolidado para OELS em ambos os isolados e para OECC para apenas um dos isolados. Em geral, OELS apresentou efeito sinérgico com florfenicol, enquanto OECC apresentou efeito aditivo. Em conclusão, ambos os óleos essenciais foram capazes de interferir na formação do biofilme e não apresentaram efeito antagônico em combinação com florfenicol. Os melhores resultados foram encontrados para OELS, que apresentou efeito sinérgico com florfenicol e capacidade de interferir na redução de biofilme consolidado.

Palavras-chave: antibiótico, aquicultura, biofilme, carvacrol, citral.

Antibacterial and antibiofilm activities and synergism with florfenicol from the essential oils of *Lippia sidoides* and *Cymbopogon citratus* against *Aeromonas hydrophila*

ABSTRACT

Aeromonas hydrophila is an opportunistic bacterium, with a high capacity for biofilm production, which can cause severe damage in aquaculture. The objective of this study was to identify the chemical compounds of the essential oils of *Lippia sidoides* (EOLS) and *Cymbopogon citratus* (EOCC), and to evaluate the biocidal, antibiofilm, and synergistic action with the antimicrobial florfenicol of these essential oils (EOs) against *A. hydrophila*. The antibacterial activity of EOLS and EOCC was verified by the minimum bactericidal concentration and by the action of these EOs against both forming and consolidated biofilms. The synergistic activity of EOs with florfenicol was performed using the checkerboard technique. The main component of EOLS and EOCC was carvacrol (44.50%) and α -citral (73.56%), respectively. Both EOs showed weak inhibitory activity ($\geq 3,125.00 \mu\text{g mL}^{-1}$). Two bacterial isolates were able to produce biofilm, and EOLS and EOCC acted upon the bacterial isolates to prevent biofilm formation. A bactericidal effect was verified for EOLS in the previously consolidated biofilm for both isolates and for EOCC in only one of the isolates. In general, EOLS had a synergistic effect with florfenicol, while EOCC had an additive effect. Both EOs were able to interfere with biofilm formation and did not have an antagonistic effect in combination with florfenicol. The best results were found for EOLS, which showed a synergistic effect with florfenicol and the ability to interfere in the formation of consolidated biofilm. This study highlights the potential of EOLS and EOCC to

interfere in biofilm and act in synergy with florfenicol to reduce the occurrence of *A. hydrophila*. Development of these compounds may contribute to the development of herbal medicines in aquaculture.

Keywords: antimicrobial, aquaculture, biofilm, carvacrol, citral.

INTRODUÇÃO

Muitas bactérias do gênero *Aeromonas* causam doenças em peixes e outros animais (Dawood et al., 2021). Dentre estas, uma das mais conhecidas é *Aeromonas hydrophila*. Ela é uma bactéria gram-negativa, oportunista em organismos produzidos na aquicultura, com grande capacidade de produção de biofilme e formação de muitas micro colônias, que podem ser encontradas nos diversos tipos de sistemas aquícolas (Lynch et al., 2002; Li et al., 2019). Ela é conhecida por causar uma diversidade de patologias em humanos como diarreia, fascite necrosante e septicemia (Ran et al., 2018). Em peixes, ela é responsável por promover exoftalmia, dermatites, ascites, hemorragias cutâneas, destruição de nadadeiras, apatia e redução de apetite, ocasionando em elevadas taxas de mortalidade e grandes perdas econômicas no setor aquícola (De Souza et al., 2019).

O setor aquícola tem apresentado um aumento de produção nos últimos anos devido as melhorias tecnológicas nos sistemas de produção, avanços no melhoramento genético, nutrição e práticas de manejo, como melhores condições para o cultivo de animais em altas densidades (sistemas superintensivos) (Acar et al., 2019; Chung et al., 2020). No entanto, é característico destes sistemas superintensivos um aumento do estresse em peixes e camarões devido à redução de espaço e elevação dos níveis de compostos nitrogenados (Lemos et al., 2018), o que pode provocar a supressão do sistema imune e aumentar a susceptibilidade a doenças infecciosas provocadas por bactérias oportunistas como as pertencentes ao gênero *Aeromonas* (Harikrishnan et al., 2010; De Souza et al., 2017). O que pode

desencadear o surto de doenças infecciosas junto com a morte de espécies cultivadas (Dawood et al., 2021).

É comum o uso de compostos químicos sintéticos (antibióticos) no tratamento de doenças na aquicultura. Entretanto, antibióticos apresentam sérias desvantagens como alta toxicidade, contaminação do ambiente, acumulação de resíduos no pescado destinado ao consumo humano, risco de seleção de patógenos resistentes (Bueno et al., 2017; De Souza et al., 2018) e morte de bactérias benéficas à aquicultura, podendo ocasionar efeitos adversos para a saúde humana e ambiental. O florfenicol é um dos antibióticos mais utilizados na aquicultura (Barreto et al., 2018), devido a sua grande capacidade bacteriostática na prevenção da síntese de proteínas bacterianas (Martins et al., 2013). Contudo, a lixiviação do florfenicol através de atividades relacionadas à aquicultura representa um risco real à saúde ambiental devido ao desenvolvimento de bactérias resistentes a sua ação (Binh et al., 2018). O agravamento deste problema ocorre principalmente onde o controle por meio da venda e fiscalização é bastante falho, como ocorre em vários países na Ásia e América Latina (Alday-Sanz et al., 2012).

Assim, a busca de produtos naturais que apresentem potencial para reduzir ou substituir o uso dos aditivos sintéticos para o controle de doenças em peixes e camarões tem se tornado cada vez mais importante (De Souza et al., 2018). Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários com enorme potencial farmacológico, que podem ser uma promissora alternativa terapêutica na ação sinérgica com antibióticos, inclusive para inibir a formação de biofilmes (De Souza et al., 2017). Eles têm potencial para serem usados na síntese de novos medicamentos, uma vez que os OEs apresentam uma grande diversidade

de compostos voláteis que atuam em inúmeras atividades biológicas com efeitos benéficos aos animais (Rodrigues et al., 2018). Dentre os seus benefícios observados em organismos aquícolas, destacam-se atividade antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária, antioxidante, anestésica, sedativa, imunomoduladora e promotora de crescimento (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008; Teixeira et al., 2018, Cunha et al., 2018; De Souza et al., 2019). Os OEs podem contribuir com ação antibacteriana nos sistemas aquícolas, uma vez que podem bloquear a síntese de proteínas e DNA, romper a parede celular bacteriana e interferir nos mecanismos de secreção de enzimas e sinalização bacteriana (Gyawali & Ibrahim, 2014).

Os OEs de *Lippia sidoides* (OELS) e *Cymbopogon citratus* (OECC) são produtos naturais com potencial de substituir ou serem utilizados de forma sinérgica com aditivos sintéticos. Em estudos prévios o uso destes OEs mostrou benefícios frente a *A. hydrophila*, mas tais estudos não avaliaram sua ação sinérgica com florfenicol, nem seu potencial contra a formação de biofilme (De Souza et al., 2018; Majolo et al., 2020). O OELS geralmente tem como componentes majoritários timol e carvacrol e o OECC comumente apresenta o citral como seu composto majoritário. Em adição, ambos os OEs se destacam por suas propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes (Al-Sagheer et al., 2017; Barbosa et al., 2017).

Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar os compostos dos OELS e OECC, bem como avaliar sua ação biocida, antibiofilme e sinérgica com o antibiótico florfenicol contra *Aeromonas hydrophila*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Comitê de ética

Os experimentos foram realizados de acordo com o Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina, PE, Brasil (nº0017/280820).

Óleos essenciais

Os exemplares de *L. sidoides* e *C. citratus* foram cultivados no herbário de plantas medicinais do Instituto Federal Sertão Pernambucano (IF – Sertão), Zona rural de Petrolina, PE, Brasil. As coletas das amostras das plantas foram realizadas em março de 2018. Os OEs foram extraídos de folhas frescas das plantas por hidrodestilação usando um aparato tipo clevenger por 2 h (European Pharmacopeia, 2007) no Laboratório de Produtos Naturais do IF Sertão PE. A determinação da composição química do OE foi realizada por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/EM) no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamento da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

A análise de CG/EM foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (Shimadzu Coporation, Kyoto, Japão), e as condições utilizadas foram: coluna DB-5MS (Agilent technologies; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); gás hélio (99,999%) como gás carregador a um fluxo constante de 1,1 mL/min; volume de injeção de 1,0 µL com proporção de divisão do injetor de 1:10 a uma temperatura de 250 °C; modo de impacto de elétrons a 70 eV; temperatura das fontes de íons a 280 °C e temperatura da linha de transferência a 260 °C. A temperatura do forno foi programada para 60 °C, com

aumento progressivo de 3 °C por min até alcançar 240 °C. Uma mistura de hidrocarbonetos lineares (C₈H₁₈ – C₂₀H₄₂) foi injetada nas mesmas condições experimentais.

A identificação dos constituintes dos OEs foi realizada pela comparação dos espectros obtidos com os do banco de dados do equipamento (Adams, 2009; NIST, 2010) e pelo índice de retenção de Kovats. Os dados foram adquiridos e processados em PC com o software Shimadzu GC-MS Solution (Shimadzu Corporation). Após a extração, os OEs foram estocados em frasco âmbar a – 4 °C.

Teste de sensibilidade *in vitro*

Foram testados seis isolados de *A. hydrophila* da coleção bacteriana do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF, Petrolina, PE, Brasil. Os isolados bacterianos foram obtidos de tecidos (rim, tegumento e intestino) de exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Uma amostra de cada OE com peso equivalente a 0,25 g foi pesada para realização do cálculo de densidade e, em seguida, a amostra foi diluída em metanol e dimetilsufóxido (1:1) formando uma solução estoque de 25.000 µg/mL. A determinação da atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo e pela CBM (concentração bactericida mínima), realizadas conforme documento M07-A9 (CLSI, 2015). Este teste consistiu em distribuir 200 µL de caldo Müller-Hinton (MHB) em placas de 96 poços. Inicialmente, foram adicionados 200 µL da solução estoque do OELS ou OECC no primeiro poço, os quais foram homogeneizados e transferidos para os poços seguintes, onde obteve-se as seguintes concentrações 12.500,0, 6.250,0,

3.125,0, 1.562,5, 781,3, 390,6, 195,3, e 97,6 µg/mL.

Para o preparo do inóculo, as colônias em MHB foram utilizadas para preparar uma suspensão bacteriana com turbidez equivalente ao padrão de McFarland 0,5, anteriormente estabelecido por espectrofotômetro a 580 nm, onde obteve-se a densidade óptica de 0,16 para isolados de *A. hydrophila* ou $7,64 \times 10^8$ CFU/mL (Unidades Formadoras de Colônias por mL). Uma amostra de 20 µL da suspensão foi inoculada nos poços da microplaca contendo o OELS ou OECC e o diluente (5 µL de metanol + 5 µL de dimetilsulfóxido). A placa foi incubada a 27 °C durante 24 h em condições aeróbias. Em seguida uma alíquota de 10 µL foi semeada na superfície do MHB. Após 24 h de incubação a 27 °C, o MBC foi definido como a concentração mais baixa de OELS e OECC necessária para matar o inóculo bacteriano. A determinação da atividade antimicrobiana do diluente foi realizada através do controle positivo (bactérias + MHB) e controle negativo (MHB).

Produção de biofilme

Para a caracterização fenotípica da produção do biofilme foi utilizado o teste da violeta genciana. Para o controle negativo deste teste, uma cepa de *Escherichia coli* DH5-alfa que não forma biofilme foi usada ao lado de poços que continham apenas caldo triptona de soja estéril (TSB) (Merino et al., 2009). Os experimentos foram realizados em diferentes períodos e quatro dos isolados testados para ensaio *in vitro* não estavam mais disponíveis na coleção bacteriana no momento desta análise. Assim, para este teste, os dois isolados restantes (RU5 e RU7) de *A. hydrophila* foram inoculados em 3 mL de TSB e incubados a 27 °C por 24 h. Uma alíquota de 5 µL foi transferida para novas

placas estéreis contendo 195 μL de TSB e reincubadas a 27 °C por 24 h. Após a reincubação, as placas foram lavadas três vezes com 200 μL de água destilada, e logo após foram coradas com 200 μL de uma solução de violeta genciana (0,25%) e expostas por 2,5 min a temperatura ambiente (25 °C). Em seguida as placas foram lavadas em água corrente e foram adicionados 200 μL de álcool acetona (80:20).

A densidade óptica (DO) de cada poço foi medida a 620 nm usando um leitor de ELISA (Elisa Asys Expert Plus BioChrom, Cambridge, United Kingdom). Após a leitura, as amostras foram classificadas como positivas ou negativas para a formação de biofilme. Com base na média do controle negativo (D_{NC}), os microrganismos poderiam ser classificados como biofilme não formador ($OD_{\text{S}} \leq OD_{\text{NC}}$), fraco ($OD_{\text{NC}} < OD_{\text{S}} \leq (2 \times OD_{\text{NC}})$), moderado ($(2 \times OD_{\text{NC}}) < OD_{\text{S}} \leq (4 \times OD_{\text{NC}})$) ou forte ($(4 \times OD_{\text{NC}}) \leq OD_{\text{S}}$) (Merino et al., 2009). A DO do meio de cultura foi de 0,07. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Atividade do antibiofilme

A interferência na produção de biofilme foi adaptada do protocolo de Nostro et al. (2007). Os isolados de *A. hydrophila* (RU5 e RU7) formaram capacidade fraca de formar biofilme. Eles foram submetidos a OELS e OECC para avaliar sua influência sobre a fase inicial de formação do biofilme, bem como na formação do biofilme consolidado. Os isolados foram utilizados devido a sua resposta a um produto natural (OELS e OECC), os quais podem ser reduzidos para não produtor.

O inóculo bacteriano foi cultivado em um tubo com 3 mL de TSB (0,25%) por 24 h a 27 °C. Para a avaliação da interferência de OELS e OECC no biofilme

consolidado, uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana foi adicionada em microplacas de 96 poços. Logo após foi adicionado uma solução que continha o equivalente à metade do valor de CBM observado na microdiluição da placa e, em seguida, a placa foi incubada a 27 °C durante 24 h antes da formação do biofilme. Passado o período de incubação os poços foram corados com 100 µL de violeta genciana (0,25%) por 5 min. Então as microplacas foram lavadas três vezes com 200 µL de água destilada para remoção de células não ligadas. A DO foi determinada após a adição de cada OE nos períodos de 0 e 24 h. A leitura foi realizada no tempo 0 h. Em seguida 200 µL da solução que continha cada OE, equivalente à metade do valor de CBM observado na microdiluição em placa, foram adicionados e incubados e a leitura foi realizada após 24 h. A interferência de OELS ou OECC no biofilme consolidado foi definida pela equação: $\text{DO média } 0 \text{ h} / \text{DO média } 24 \text{ h} \times 100$.

Para o controle negativo e para o controle do processo (que visa verificar possível contaminação) foi utilizado o TSB estéril. A DO foi medida a 620 nm em um leitor de microplacas ELISA e os ensaios foram realizados em triplicata. A interferência de cada OE no biofilme foi realizada após comparação da formação inicial do biofilme com a formação do biofilme após o uso do OELS ou OECC (Nostro et al., 2007).

Efeito sinérgico dos óleos essenciais com florfenicol

A padronização da suspensão bacteriana foi realizada a partir de uma cultura incubada por 24 h em MHB adicionada de solução salina tamponada com fosfato estéril pH 7,0 até atingir uma turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 (equivalente a uma suspensão 1×10^8 UFC/mL). Em seguida, 100

μL de MHB foi adicionado a todos os poços. Na linha A foi adicionado 100 μL de antibiótico florfenicol (2 mg/mL) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em uma concentração quatro vezes maior do que a concentração inibitória mínima (CIM) para realizar a diluição em série até a linha H. Na coluna 1 foram adicionados 100 μL da solução correspondente ao produto natural na concentração de 8 vezes superior a CIM para realizar a diluição serial até a coluna 10. Nos poços A11, B11 e C11 foram adicionados 10 μL de solução bacteriana e 100 μL de MHB (controle positivo). Nos poços A12, B12, C12 foram adicionados 100 μL de MHB (controle negativo). Em seguida foram incubadas a 27 °C durante 24 h. Após o período de incubação, 20 μL de uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio foram adicionados em todos os poços.

O índice de fração inibitório (IFI) foi calculado usando a seguinte equação: IFI produto natural = CIM combinado/CIM isolado ou antibiótico IFI = CIM combinado/CIM isolado. A soma dos IFIs ($\Sigma\text{IFI} = \text{IFI produto natural} + \text{IFI antibiótico}$) foi utilizada para classificar os efeitos por meio da equação: Sinergismo = $\Sigma\text{IFI} \leq 0,5$; aditivo = $0,5 < \Sigma\text{IFI} < 1$; indiferente = $1 < \Sigma\text{IFI} < 2$; e antagonismo = $\Sigma\text{IFI} > 2$ (adaptado de Lee et al., 2012).

RESULTADOS

Foram identificados 52 componentes químicos no OELS correspondendo a 100% do total, onde os componentes majoritários encontrados foram o carvacrol (44,50%), *p*-cymene (14,06%) e thymol (7,99%) (Tabela 1). Para o OECC foram identificados 46 componentes químicos correspondente a 99,61% do total, onde *a*-citral (73,56%), myrcene (12,65%) e o geraniol (3,51%) foram

identificados como compostos majoritários (Tabela 2).

A eficácia bactericida dos OELS e OECC foi estimada pelo método de CBM que mostrou que os isolados de *A. hydrophila* foram sensíveis para concentrações de 3.125 (50,00%) e 6.250 (50,00%) µg/mL de OELS. Para a atividade bactericida do OECC, foi verificada sensibilidade dos isolados de *A. hydrophila* nas concentrações de 3.125 (33,33%), 6.250 (16,67%) e 12.500 (50,00%) µg/mL (Fig. 1).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides*. TR = Taxa de retenção. IRL = índice de retenção na literatura (Adams, 2009; NIST, 2010).

Composição química	TR	IRL	Área (%)
α -Thujene	3,458	902	1,41
α -Pinene	3,585	948	0,35
3-butenyl propyl ether	3,640	783	0,02
3-Ethyl-3-methyl-2-pentanone	3,773	868	0,03
Sabinene	4,172	928	0,40
β -Pinene	4,263	943	0,24
Octan-3-one	4,305	952	0,04
Myrcene	4,389	958	1,64
2-Ethylhexanol	4,445	979	0,04
(3Z)-Hexenyl acetate	4,636	992	0,01
α -Phellandrene	4,699	969	0,20
α -Terpinene	4,919	919	2,51
<i>p</i> -Cymene	5,075	1042	14,06
Limonene	5,156	1018	0,40
Eucalyptol	5,226	1032	1,46
trans- β -Ocimene	5,473	976	0,34
γ -Terpinene	5,762	998	12,43
trans-Sabinene hydrate	5,947	1041	0,23

(<i>E</i>)-Myroxide	6,446	1140	0,29
cis- β -Terpineol	6,620	1158	0,44
cis- <i>p</i> -menth-2-en-1-ol	7,176	1109	0,05
(<i>S</i>)-ipsdienol	7,697	1120	1,11
Ethanone, 1-(methylenecyclopropyl)-	8,040	1184	0,03
Terpin Hydrate	8,298	1282	0,06
3-Thujen-2-one	8,444	1073	0,09
(-)-4-Terpineol	8,566	1137	0,83
α - α -4-Trimethyl-benzenemethanol	8,736	1197	0,07
α -Terpineol	8,891	1143	0,19
[1,1'-Bicyclopentyl]-2-one	9,144	1273	0,03
2-(2-octenyl)-Cyclopentanone	9,609	1085	0,03
Nerol	9,775	1228	0,01
Thymol methyl ether	9,964	1231	0,36
β -citral	10,899	1174	0,97
Thymol	11,521	1289	7,99
Carvacrol	11,836	1298	44,50
(-)- β -Elemene	12,704	1431	0,05
3-Allylguaiacol	13,230	1392	0,07
Carvacryl acetate	13,574	1421	0,28
α -Copaene	13,740	1221	0,12
(<i>E</i>)-Caryophyllene	14,909	1494	3,56
α -Chamigrene	15,055	1512	0,03
trans- α -Bergamotene	15,227	1430	0,02
Aromadendrene	15,406	1386	0,13
Dihydropseudoionone	15,604	1420	0,02
α -Humulene	15,777	1579	0,20
3-tert-Butyl-4-hydroxyanisole	16,499	1417	0,83
Bicyclogermacrene	16,869	1603	0,65
β -Bisabolene	17,064	1500	0,09
δ -Cadinene	17,490	1469	0,10
Elemol	18,132	1522	0,07

Spathulenol	18,886	1536	0,28
Caryophyllene oxide	19,035	1507	0,64
Total			100,00

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. TR = Taxa de retenção. IRL = índice de retenção na literatura (Adams, 2009; NIST, 2010)

Composição química	TR	IRL	Area (%)
β -Pinene	3,385	943	0,02
α -Thujene	3,456	902	0,03
1-(3-ethyloxiranyl)-Ethanone	3,773	868	0,02
Vinyl amyl carbinol	4,170	969	0,05
Sulcatone	4,308	938	0,71
Myrcene	4,391	958	12,65
1,5-dimethyl-1,5-Cyclooctadiene	5,145	1103	0,01
β -Ocimene	5,250	976	0,47
2,5,5-trimethyl-1,6-Heptadiene	5,600	888	0,08
Seudenone	5,729	962	0,03
1,2-Oxolinalool	6,036	1182	0,06
(E)-Myroxide	6,445	1145	0,17
Linalool	6,595	1101	1,00
Myrtanal	6,810	1126	0,10
5-(methylenecyclopropyl)-1-Pentanol	6,963	1128	0,10
2,3,4,5-Tetramethyl-2-cyclopentenone	7,473	1054	0,03
β -citral	7,667	968	0,49
trans-Chrysanthemol	7,861	1230	0,37
2,6-dimethyl-1,5,7-Octatrien-3-ol	7,965	1120	0,06
Isogeranial	8,146	1136	1,08
Rosefurane epoxide	8,415	1177	0,01
Isogeranial	8,597	948	1,83
Lilac aldehyde C	8,952	1197	0,18
Estragole	9,065	1172	0,04

[1,1'-Bicyclopentyl]-2-one	9,148	1273	0,05
cis-Carveol	9,300	1206	0,05
6,7-Dihydrogeraniol	9,767	1179	0,31
2,3-epoxygerianial	9,923	1215	0,10
Geraniol	10,457	1228	3,51
α -citral	10,954	1174	73,56
Epoxy-linalooloxide	11,303	1224	0,35
Undecan-2-one	11,452	1251	0,31
Geranyl formate	11,691	1349	0,02
5-Hexenyl laurate	12,688	1986	0,05
Geranic acid	13,107	1342	0,21
trans-2-[2'-(2"-Methyl-1"-propenyl)cyclopropy	13,638	1056	0,07
Geranyl acetate	13,800	1380	0,66
Verbenone	14,820	1119	0,03
(E)-Caryophyllene	14,901	1494	0,15
α -cis-Bergamotene	15,230	1430	0,03
2-Tridecanone	16,665	1449	0,24
Caryophyllene oxide	19,033	1507	0,07
Selina-6-en-4-ol	19,874	1593	0,08
m-Camphorene	27,023	1940	0,03
trimethylsilyl ester-Palmitic acid	28,812	1987	0,05
Adipic acid	35,172	2414	0,04
Oleoyl chloride	35,680	2131	0,03
Total			99,61

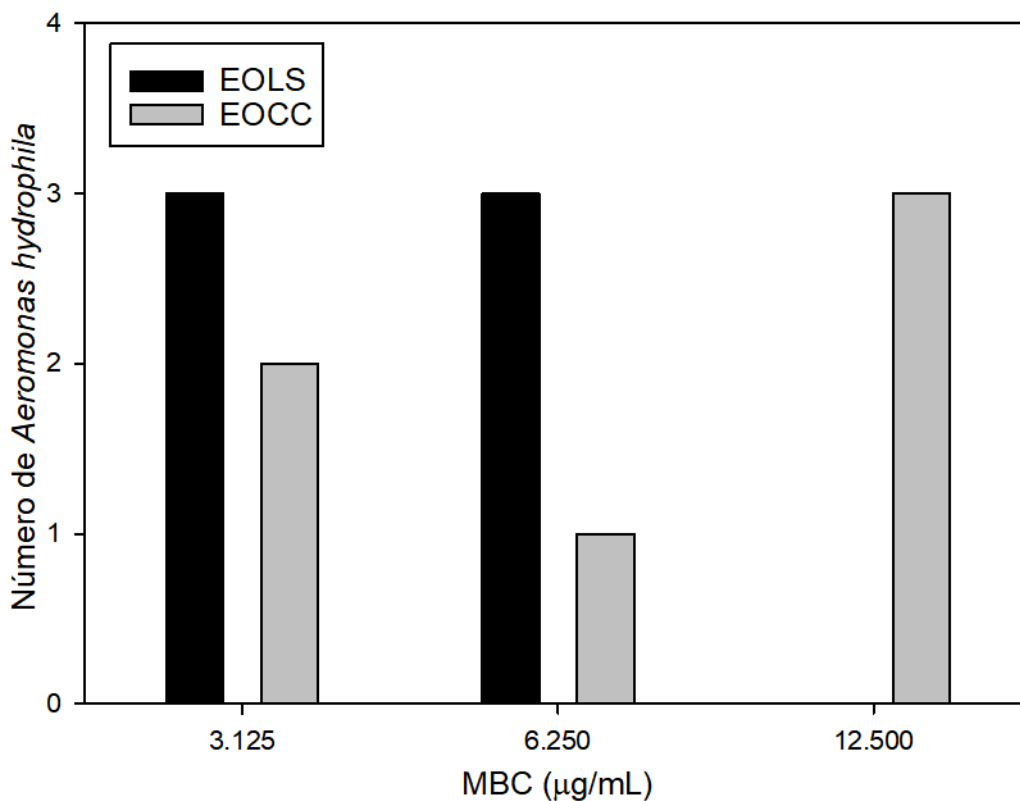


Figura 1. Concentração mínima de bactérias (MBC) dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (OELS) e *Cymbopogon citratus* (EOCC) contra *Aeromonas hydrophila* (n = 6).

No teste para determinar a habilidade de produção de biofilme, dois isolados de *A. hydrophila* apresentaram capacidade de produzir biofilme, sendo tais cepas bacterianas classificadas com fraca capacidade de produzir biofilme (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação dos isolados de *Aeromonas hydrophila* para produção de biofilme.

Isolado	OD	Classificação
---------	----	---------------

RU5	0,86	Fraco produtor
RU7	0,81	Fraco produtor

Os isolados de *A. hydrophila* RU5 e RU7 foram classificados como não produtor e fraco produtor de biofilme para o OELS (OD = 0,065 e 0,087, respectivamente). Para OECC, ocorreu o inverso, onde os isolados de *A. hydrophila* RU5 e RU7 foram classificados como fraco produtor e não produtor de biofilme para o OELS (OD = 0,082 e 0,067, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4. Interferência dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (OELS) e *Cymbopogon citratus* (OECC) na formação de biofilme em *Aeromonas hydrophila* isolados que foram previamente classificados como fracos produtores de biofilme. OD = densidade óptica.

Isolado	OELS	
	OD	Classificação
RU5	0,065	Não produtor
RU7	0,087	Fraco produtor
Isolado	OECC	
	OD	Classificação
RU5	0,082	Fraco produtor
RU7	0,067	Não produtor

Foi verificado efeito bactericida no biofilme previamente consolidado para OELS, pois ocorreu uma redução da DO durante o período compreendido entre 0 e 24 h (20,00 e 13,21%, respectivamente para RU5 e RU7). Para o OECC, apenas RU7 causou uma redução da DO (55,10%) durante o mesmo período (0 a 24 h), o que não ocorreu para RU5, onde a DO aumentou neste mesmo período (185,71%) (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (OELS) e *Cymbopogon citratus* (OECC) no biofilme consolidado de *Aeromonas hydrophila*. OD = densidade óptica.

Isolado	OELS		
	DO a 0 h	DO a 24 h	DO 24 h – 0 h (%)
RU5	0,005	0,001	20,00
RU7	0,053	0,007	13,21
Isolado	OECC		
	DO a 0 h	DO a 24 h	DO 24 h – 0 h (%)
RU5	0,021	0,039	185,71
RU7	0,049	0,027	55,10

Em relação ao potencial sinérgico com o antibiótico florfenicol, verificou-se que EOLS apresentou um efeito aditivo ($\Sigma IFI = 0,75$) e dois efeitos sinérgicos ($\Sigma IFI = 0,18$ e $0,25$) e que EOCC apresentou dois efeitos aditivos ($0,50$ e $0,62$) e

um efeito indiferente (1,50). Em geral, OELS apresentou efeito sinérgico com florfenicol, enquanto EOCC apresentou apenas efeito aditivo (Tabela 6).

Tabela 6. Índice de fração inibitória (IFI) usada para determinar o efeito sinérgico entre óleos essenciais de *Lippia sidoides* (OELS) e *Cymbopogon citratus* (EOCC) e florfenicol em *Aeromonas hydrophila*. CMB = Concentração mínima de bactérias.

Substância testada	CMB ($\mu\text{g/mL}$)		IFI	ΣIFI
	Isolad o	Combinad o		
OELS	6.250	1.562,50	0,25	0,75
Florfenicol	63,50	31,75	0,50	
OELS	3.125	781,25	0,13	0,25
Florfenicol	0,312	0,078	0,12	
OELS	6.250	390,62	0,06	0,18
Florfenicol	0,625	0,078	0,12	
EOCC	12.500	12.500	1,00	1,50
Florfenicol	63,50	31,75	0,50	
EOCC	3.125	3.125	0,50	0,62
Florfenicol	0,312	0,078	0,12	
EOCC	6.250	1.562,5	0,25	0,50
Florfenicol	0,625	0,16	0,25	

DISCUSSÃO

Carvacrol e *a*-citral foram os principais componentes químicos de OELS e OECC, respectivamente. No presente estudo, estes compostos (isolados ou em interação com compostos minoritários) desencadearam a atividade antibacteriana verificada contra *A. hydrophila*. Isto se deve a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral e antifúngica de carvacrol e *a*-citral, além deles serem considerados promotores de saúde na indústria alimentícia (Saddiq & Khayat, 2010; Lima et al., 2013; Chueca et al., 2014; Sharifi-Rad et al. 2017, Sutili et al., 2019).

O OELS é rico principalmente em thymol e carvacrol, compostos que apresentam atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (Guimarães et al., 2015). Em nosso estudo, carvacrol (44,50%) foi o composto químico predominante e timol foi apenas o terceiro composto mais abundante (7,99%). Em geral, para OELS com plantas cultivadas na mesma região do nosso estudo (Nordeste do Brasil), thymol tem sido encontrado como seu principal constituinte químico (Guimarães et al., 2015; Marchese et al., 2016). Apesar disso, existem outros estudos para a mesma região que, de forma similar ao corrente estudo, encontraram carvacrol como principal composto de OELS (Lima et al., 2011; Farias-Junior et al 2012; Guimarães et al., 2014).

Farias-Júnior et al. (2012) mostraram que OELS ricos em timol ou em carvacrol tem atividade leishmanicida e o OELS rico em carvacrol foi mais eficaz do que o OELS rico em timol. Os efeitos antibacterianos do carvacrol são atribuídos à sua capacidade de permeabilizar e despolarizar a membrana

citoplasmática, aumentando os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e induzindo danos à membrana em bactérias (Li et al., 2014).

Semelhante ao carvacrol, o citral causa danos oxidativos ao DNA bacteriano pela formação de ROS (Chueca et al., 2014). A ação antibacteriana de OECC deve-se principalmente a citral (uma mistura natural dos isômeros *a*-citral e *b*-citral), sua principal substância química (Oliveira et al., 2010; Millezi et al., 2013; Al-Sagheer et al., 2018; Shendurse et al., 2021). Em nosso estudo chama a atenção ao baixo percentual de *b*-citral (0,97%) presente no OECC, embora, em termos gerais, similarmente aos estudos previamente citados, citral foi o composto majoritário devido ao alto percentual de *a*-citral (73,56%) encontrado em sua composição química.

Valores de concentração inibitória mínima (MIC) acima de 3000 µg/mL são consideradas de fraca atividade (Sartorato et al., 2004). No corrente estudo, todos os isolados de *A. hydrophila* testados apresentaram sensibilidade acima deste valor, o que demonstra que ambos os OEs do nosso estudo demonstraram fraca atividade contra esta bactéria. Em geral, atividades antimicrobianas são baseadas em MIC, cujos valores são menores do que aqueles encontrados em MBC (De Souza et al., 2017) e, portanto, os isolados testados poderiam apresentar valores mais baixos, o que indicaria uma melhor capacidade de resposta de OELS e OECC contra *A. hydrophila*.

A eficiência de cada OE depende da mistura e proporção das composições químicas dos compostos bioativos, que mudam sazonalmente, além de diferirem também devido a outros fatores, como características ambientais do local de cultivo, parte da planta extraída e época do ano e método de extração do OE (Limma Netto et al., 2017; Cunha et al., 2018; Dawood et al.,

2021). Provavelmente devido a tais divergências, outros estudos podem encontrar efeitos mais promissores quanto a ação antimicrobiana de OEs de plantas do mesmo gênero daquelas usadas em nosso estudo.

Majolo et al. (2017) verificaram efeito inibitório moderado para OELS e efeito inibitório fraco para os OEs de *Lippia alba* e *Lippia origanoides*, contra *A. hydrophila*. Por outro lado, outros estudos verificaram forte atividade contra *A. hydrophila* do OE de *L. origanoides* (Bandeira Junior et al., 2019) e moderada atividade contra *Aeromonas* spp. do OE de *L. alba* (Sutilli et al., 2015; De Souza et al., 2017). Foi encontrado para OECC um forte efeito inibitório contra *A. hydrophila* e também contra *Aeromonas* spp., *Aeromonas salmonicida*, e *Aeromonas veronii* (Starliper et al., 2015). Os OEs de *Cymbopogon nardus* e *Cymbopogon flexuosus* tiveram alto efeito inibitório contra *A. hydrophila* e *Aeromonas* spp., respectivamente (Wei & Wee, 2013; De Souza et al., 2018).

Muitos óleo essenciais contêm compostos fenólicos que são responsáveis por seus efeitos antimicrobianos e os mecanismos de ação dependem de sua composição (Cunha et al., 2018). O caráter lipofílico dos compostos OE permite que eles penetrem na membrana celular, podendo afetar a síntese de lipídios da membrana. Consequentemente, isto pode alterar a estrutura e a fluidez da membrana (Bouyahya et al., 2017), provocando vazamento, dissolução e/ou coagulação de compostos celulares e deixando proteínas de membrana ATPase mais permeáveis à liberação de moléculas ou íons essenciais (Bakkali et al., 2008), causando morte bacteriana.

Citral tem considerável atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Saddiq & Khayyat, 2010) e o seu principal modo de ação está relacionado à sua interação com lipídios a membrana celular,

causando vazamento de potássio e constituintes celulares que podem levar à morte celular (Bard et al., 1988; Scariot et al., 2021). Citral altera o pH intracelular, a integridade e o potencial da membrana e a concentração de ATP intracelular (Chueca et al., 2014; Shi et al., 2016). Em adição, o citral modifica as paredes celulares das leveduras, aumentando sua suscetibilidade à atividade da glucanase (Scariot et al., 2021).

O carvacrol, como outros terpenoides, afeta a permeabilidade da membrana, bem como proteínas de membrana e enzimas periplasmáticas (Sharifi-Rad et al., 2017). O carvacrol reduz o ATP intracelular ao inibir o sistema de transporte de elétrons, o que resulta em destruição da membrana celular e consequente morte celular após vazamento maciço de íons (Mittal et al., 2019). Carvacrol e seus derivados têm grupo hidroxila livre e elétrons deslocalizados que podem ser responsáveis pela troca de íons H^+ no citoplasma e íons K^+ no meio extracelular (Bem Arfa et al., 2006; Burt et al., 2007).

Geralmente, bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos OEs do que as Gram negativas devido aos ácidos lipoteicóicos e peptidoglicanos nas membranas celulares que podem facilitar a penetração de compostos hidrofóbicos do OE (Zanetti et al., 2015), os quais podem agir tanto na parede celular, quanto no meio intracelular (Nazzaro et al., 2013). A maior resistência das bactérias Gram-negativas é explicada devido a presença de uma membrana extra (composta por uma camada dupla de fosfolipídios ligados à camada de peptidoglicano por lipopolissacarídeos) na parede celular das bactérias Gram-negativas. Apesar disso, algumas moléculas hidrofóbicas podem penetrar na célula por meio de proteínas porinas que formam canais cheios de água distribuídos por toda a parede celular (Nikaido 1994; Nazzaro et al. 2013).

De acordo com Rasmussen-Ivey et al. (2016), a virulência em *A. hydrophila* é multifatorial, acompanhada pela alta capacidade de formação de biofilme. Biofilmes são ecossistemas microbiológicos embutidos em matrizes de polímeros orgânicos e aderidos a uma superfície (Millezi et al. 2013). A capacidade das bactérias de resistir aos antimicrobianos pode ser aumentada de 10 a 1.000 vezes pela presença de biofilme, o que conseqüentemente aumenta seus danos ao sistema imunológico do hospedeiro (Clutterbuck et al., 2007) e reduz o potencial de ação de antibióticos, uma vez que os biofilmes apresentam maior tolerância e resistência a estes compostos sintéticos, dificultando o tratamento de infecções (Wu et al., 2014). Isto demonstra que a formação de biofilme interfere na virulência da cepa. A resistência causada por biofilmes possivelmente se deve à presença de polissacarídeos que revestem e protegem o microrganismo de agentes externos (Clutterbuck et al., 2007).

Notavelmente as conseqüências da presença de biofilme no meio aquícola aumentam a capacidade de danos geradas pelas bactérias, conforme observado na alta suscetibilidade das redes de pesca em gaiola à formação de biofilme (Ashraf & Edwin 2016). Em nosso estudo, ambos os OEs apresentaram capacidade de inibir a formação de biofilme e inclusive foram eficazes para reduzir o biofilme consolidado (com destaque para OELS), os quais são mais difíceis de controlar (De Souza et al., 2017). Apesar disso, o ideal é prevenir a formação do biofilme e evitar danos mais severos aos animais causados pelo biofilme consolidado. Os danos à parede bacteriana causados por OEs podem reduzir a capacidade de fixação e comprometer o estágio inicial de formação do biofilme (Burt, 2004). Os OEs também podem atuar nos sistemas de detecção de quorum sensibilidade (mecanismo pelo qual a população bacteriana mede

sua densidade celular), reduzindo a coordenação das interações bactéria-bactéria responsáveis pela formação de biofilme, esporulação e acasalamento (Nazzaro et al., 2013; Bouyahya et al., 2017). Similarmente, estudos anteriores verificaram a capacidade de OE. de *L. alba* (De Souza et al., 2017) OECC (Millezi et al., 2013) e citral e carvacrol (Bandeira Junior et al., 2018) em evitarem a formação de biofilmes de *Aeromonas* spp.

A atividade antimicrobiana de OEs combinados com antibióticos convencionais pode apresentar efeitos benéficos, que permitem potencializar o efeito antimicrobiano e permitir que antibióticos já ineficazes voltem a ser eficazes (De Souza et al., 2017) ou possam ser usados em menores concentrações (De Souza et al., 2018). Esta mistura também tem um efeito sinérgico na destruição de leveduras e biofilmes bacterianos (Pirog et al., 2019). Isso provavelmente reduz a probabilidade de surgimento de resistência microbiana. Em adição, Barreto et al. (2018), verificou que o revestimento com óleo vegetal é um método eficiente para reduzir a lixiviação do florfenicol. Na presença de OE, o antibiótico entra rapidamente na célula microbiana, precedendo a ativação da resistência patogênica e, portanto, não é desativado (Owen & Laird, 2018; Vitanza et al., 2018), rompendo a integridade da membrana citoplasmática, o que reduz a possibilidade de surgimento de microrganismos resistentes (Pirog et al., 2019).

No presente estudo, nenhuma das combinações testadas teve efeito antagônico com florfenicol, demonstrando ser possível estabelecer uma terapia combinada. O OELS apresentou efeito sinérgico com florfenicol e reduziu as concentrações eficazes de antimicrobianos, demonstrando que ele poderia contribuir para a redução da resistência bacteriana ao antibiótico. O OECC, por

sua vez, apresentou efeito aditivo e demonstrou potencial para o tratamento de doenças bacterianas. Similarmente, Bandeira Júnior et al. (2018) verificaram que citral e carvacrol tiveram efeito aditivo com florfenicol contra *A. hydrophila*. Uma combinação de OE de *L. alba* com florfenicol contra *Aeromonas* spp. também demonstrou efeito sinérgico benéfico (De Souza et al., 2017). Em uma visão geral, a combinação de OEs e antibióticos pode aumentar a eficácia dos antibióticos contra patógenos e reduzir seus efeitos colaterais (Mittal et al., 2019).

CONCLUSÃO

A atividade antimicrobiana contra *A. hydrophilla* foi influenciada por carvacrol e *a*-citral, principais componentes de OELS e OECC, respectivamente. Ambos os OEs foram capazes de interferir na formação do biofilme e não apresentaram efeito antagônico em combinação com florfenicol. Em adição, OELS rico em citral apresentou efeito sinérgico com florfenicol, além dele ter apresentado uma maior capacidade para redução de biofilme consolidado comparado ao OECC. Portanto, ambos os OEs, mas principalmente OELS, podem ser uma importante alternativa para o desenvolvimento de fitoterápicos para o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias na aquicultura.

REFERÊNCIAS

ACAR, U.; KESBIÇ, O.S.; INANAN, B.E.; YILMAZ, S. Effects of dietary Bergamot (*Citrus bergamia*) peel oil on growth, haematology and immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture Research*,

v. 50, p. 3305–3312, 2019.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil component by chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois, 2009.

AL-SAGHEER, A.A.; MAHMOUD, H.K.; REDA, F.M.; MAHGOUB, S.A.; AYYAT, M.S. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidante and imune activities. *Aquaculture Nutrition*, v. 24, p. 1006–1014, 2018.

ALDAY- SANZ, V.; CORSIN, F.; IRDE, E.; BONDAD-REANTASO, M.G. Survey on the use of veterinary medicines in aquaculture, in: M.G. Bondad-Reantaso, J.R. Arthur, R.P. Subasinghe (Eds.), *Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production*, FAO Fisheries Technical Paper N° 547, Rome, FAO, 2012, pp. 29–44.

ASHRAF, P.M.; EDWIN, L. Nano copper oxide incorporated polyethylene glycol hydrogel: An eficiente antifouling coating for cage fishing net. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 115, p. 39–48, 2016.

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

BANDEIRA JUNIOR, G.; SOUZA, C.F.; BALDISSERA, M.D.; DESCOVI, S.N.; DA SILVEIRA, B.P.; TASCA, C.; MOURÃO, R.H.V.; DE VARGAS, A.P.C.; BALDISSEROTTO, B. Plant essential oils against bacteria isolated from fish: An in vitro screening and in vivo efficacy of *Lippia origanoides*. *Ciência Rural*, v. 49, p. e20190064, 2019.

BANDEIRA JUNIOR, G.; SUTILI, F.J.; GRESSLER, L.T.; ELY, V.L.; SILVEIRA, B.P.; TASCA, C.; REGHELIN, M.; MATTER, L.B.; VARGAS, A.P.C.; BALDISSEROTTO, B. Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 125, p. 655–665, 2018.

BARBOSA, R.; CRUZ-MENDES, Y.; SILVA-ALVES, K.S.; FERREIRA-DASILVA, F.W.; RIBEIRO, N.M.; MORAIS, L.P.; LEAL-CARDOSO, J.H. Effects of *Lippia sidoides* essential oil, thymol, p-cymene, myrcene and caryophyllene on rat sciatic nerve excitability. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 50, p. e6352, 2017.

BARD, M.; ALBRECHT, M.R.; GUPTA, N.; GUYNN, C.J.; STILLWELL, W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids*, 23, p. 534–538, 1988.

BARRETO, F.M.; DA SILVA, M.R.; BRAGA, P.A.C.; BRAGOTTO, A.P.A.; HISANO, H.; REYES, F.G.R. Evaluation of the leaching of florfenicol from coated medicated fish feed into water, *Environmental Pollution*, v. 242, p.

1245–1252, 2018.

BEN ARFA, A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOU, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, p. 149–54, 2006.

BINH, V.N.; DANG, N.; ANH, N.T.K.; KY, L.X.; THAI, P.K. Antibiotics in the aquatic environment of Vietnam: Sources, concentrations, risk and control strategy. *Chemosphere*, v. 197, p. 438–450, 2018.

BOUYAHYA, A.; BAKRI, Y.; ET-TOUYS, A.; TALBAOUI, A.; KHOUHLAA, A.; CHARFI, S.; ABRINI, S.; DAKKA, N. Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, v. 14, p. 1–11, 2017.

BUENO, I.; WILLIAMS-NGUYEN, J.; HWANG, H.; SARGEANT, J.M.; NAULT, A.J.; SINGER, R.S. Impact of point sources on antibiotic resistance genes in the natural environment: A systematic review of the evidence. *Animal Health Research Reviews*, v. 18, p. 112–127, 2017.

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

BURT, S.A.; VAN DER ZEE, R.; KOETS, A.P.; DE GRAAFF, A.M.; VAN

- KNAPEN, F.; GAASTRA, W.; HAAGSMAN, H.P.; VELDHUIZEN, E.J.A. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 4484–4490, 2007.
- CHUECA, B.; PAGÁN, R.; GARCÍA-GONZALO, D. Oxygenated monoterpenes citral and carvacrol cause oxidative damage in *Escherichia coli* without the involvement of tricarboxylic acid cycle and Fenton reaction. *International Journal of Food Microbiology*, v. 189, p. 126–31, 2014.
- CHUNG, S.; LEMOS, C.H.P.; TEIXEIRA, D.V.; FORTES-SILVA, R.; COPATTI, C.E. Essential oil from *Ocimum basilicum* improves growth performance and does not alter biochemical variables related to stress in pirarucu (*Arapaima gigas*). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 92, p. e20181374, 2020.
- CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, v. 121, p. 1–17, 2007.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. M07–A10: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-tenth edition. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- DA CUNHA, J.A.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. The effects of

essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens – A review. *Journal of Applied Microbiology*, v. 125, p.328–344, 2018.

DAWOOD, M.A.O.; EL BASUINI, M.F.; ZAINELDIN, A.I.; YILMAZ, S.; HASAN, M.T.; AHMADIFAR, E.; EL ASELY, A.M.; ABDEL-LATIF, H.M.R.; ALAGAWANY, M.; ABU-ELALA, N.M.; VAN DOAN, H.; SEWILAM, H. Antiparasitic and antibacterial functionality of essential oils: an alternative approach for sustainable aquaculture. *Pathogens*, v. 10, p. 185, 2021.

DE SOUZA, E.M.; DE SOUZA, R.C.; DA COSTA, M.M.; PINHEIRO, C.G.; HEINZMANN, B.M.; COPATTI, C.E. Chemical composition and evaluation of the antimicrobial activity of two essential oils. *Bol. Inst. Pesca*, v. 44, p. e321, 2018.

DE SOUZA, R.C.; COSTA, M.M.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; SCHMIDT, D.; CARON, B.O.; COPATTI, C.E. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. *Microbial Pathogenesis*, v. 113, p. 29–33, 2017.

DE SOUZA, R.C.; DE SOUZA, E.M.; DA COSTA, M.M.; MELO, J.F.B.; BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C.E. Dietary addition of the essential oil from *Lippia alba* to Nile tilapia and its effect after inoculation with *Aeromonas* spp. *Aquaculture Nutrition*, v. 25, p. 39–45, 2019.

FARIAS-JUNIOR, P.A.; RIOS, M.C.; MOURA, T.A.; ALMEIDA, R.P.; ALVES,

P.B.; FERNANDES, R.P.M.; SCHER, R.; BLANK, A.F. Leishmanicidal activity of carvacrol rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Biological Research*, v. 45, p. 399–402, 2012.

GUIMARÃES, L.G.L.; DA SILVA, M.L.M.; REIS, P.C.J.; COSTA, M.T.R.; ALVES, L.L. General characteristics, phytochemistry and pharmacognosy of *Lippia sidoides*. *Natural product communications*, v. 10, p. 1861–1867, 2015.

GUIMARÃES, L.G.L.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, R.M.; ZARCONI, A.B.; SANTOS, G.R. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: Composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. *Revista das Ciências Agrárias*, v. 45, p. 267–275, 2014.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agentes. *Food Control*, v. 46, p. 412–429, 2014.

HARIKRISHNAN, R.; HEO, J.; BALASUNDARAM, C.; KIM, M.-C.; KIM, J.-S.; HAN, Y.-J.; HEO, M.-S. Effect of *Punica granatum* solvent extracts on immune system and disease resistance in *Paralichthys olivaceus* against lymphocystis disease virus (LDV). *Fish Shellfish Immunology*, v. 29, p. 668–673, 2010.

LEE, Y.-S.; JANG, K.-A.; CHA, J.D. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p. 618081, 2012.

- LEMOS, C.H.P.; RIBEIRO, C.V.M.; DE OLIVEIRA, C.P.B.; COUTO, R.D.; COPATTI, C.E. Effects of interaction between pH and stocking density on the growth, haematological and biochemical responses of Nile tilapia juveniles. *Aquaculture*, v. 495, p. 62–67, 2018.
- LI, H.; YANG, T.; LI, F.Y.; YAO, Y.; SUN, Z.M. Antibacterial activity and mechanism of action of *Monarda punctata* essential oil and its main components against common bacterial pathogens in respiratory tract. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 7, p. 7389–7398, 2014.
- LI, Z.; WANG, Y.; LI, X.; LIN, Z.; LIN, Y.; SRINIVASAN, R.; LIN, X. The characteristics of antibiotic resistance and phenotypes in 29 outer-membrane protein mutante strains in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Microbiology*, v. 21, p. 4614–4628, 2019.
- LIMA, M. DA S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; DE SANTANA, W.A.; MARTINS KANETO, C.; PEREIRA SOARES, M.B.; VILLARREAL, C.F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. *European Journal of Pharmacology*, v. 699, p. 112–117, 2013.
- LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; MORAIS, J.C.; CARVALHO, S.M.; RODRIGUES, V.G.; GUIMARÃES, L.G.L. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ciência Agrotecnológica*, v. 35, p.

664–671, 2011.

LIMMA-NETTO, J.D.; OLIVEIRA, R.S.M.; COPATTI, C.E. Efficiency of essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the sedation and anaesthesia of Nile tilapia juveniles. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, p. 2971–2974, 2017.

LYNCH, M.J.; SWIFT, S.; KIRKE, D.F.; KEEVIL, C.W.; DOOD, C.E.R.; WILLIAMS, P. The regulation of biofilm development by quórum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Microbiology*, v. 4, p. 18–28, 2002.

MAJOLO, C.; DA ROCHA, S.I.B.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C. M.; BIZZO, H.R. Chemical composition of *Lippia* spp. Essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, v. 48, p. 2380–2387, 2017.

MAJOLO, C.; SILVA, A.M.S.; MONTEIRO, P.C.; BRANDÃO, F.R.; CHAVES, F.C.M.; CHAGAS, E.C. Atividade antibacteriana do óleo essencial e extratos de *Lippia sidoides* (cham.) Verbenaceae e do timol frente à *Aeromonas hydrophila*. *Biota Amazônica*, v. 10, p.46–49, 2020.

MARCHESE, A.; ORHAN, I.E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S.F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S.M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, v. 210, p. 402–14, 2016.

MARTINS, A.; GUIMARÃES, L.; GUILHERMINO, L. Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, v. 36, p. 1022–1032, 2013.

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J.; SOLANO, C.; CALVO, E.; LOPEZ, J.A.; FOSTER, T.J.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. Protein A-Mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 191, p. 832–843, 2009.

MILLEZI, A.F.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless steel surface by essential oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, p. 73–80, 2013.

MITTAL, R.P.; RANA, A.; JAITAK, V. Essential oils: An impending substitute of synthetic antimicrobial agents to overcome antimicrobial resistance. *Current Drug Targets*, v. 20, p. 605–624, 2019.

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

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science*, v. 264, p. 382–388, 1994.

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

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, v. 21, p. 549–553, 2010.

OWEN, L.; LAIRD, K. Synchronous application of antibiotics and essential oils: Dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 44, p. 414–435, 2018.

PIROG, T.P.; KLIUCHKA, I.V.; KLIUCHKA, L.V. synergistic action on microorganisms of complex of essential oils with the biocides. *Biotechnologia Acta*, v. 12, p. 5–18, 2019.

RAN, C.; QIN, C.; XIE, M.; ZHANG, J.; LI, J.; XIE, Y.; WANG, Y.; LI, S.; LIU, L.; FU, X.; LIN, Q.; LI, N.; LILES, M.R.; ZHOU, Z. *Aeromonas veronii* and aerolysin are important for the pathogenesis of motile aeromonad septicemia in cyprinid fish. *Environmental Microbiology*, v. 20, p. 3442–3456, 2018.

RASMUSSEN-IVEY, C.R.; FIGUERAS, M.J.; MCGAREY, D.; LILES, M.R.

Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: In the wake of reclassification. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1337, 2016.

RODRIGUES, F.F.G.; COLARES, A.V.; NONATO, C.F.A.; GALVÃO-

RODRIGUES, F.F.; MOTA, M.L.; BRAGA, M.F.B.M.; DA COSTA, J.G.M. *In vitro* antimicrobial activity of the essential oil from *Vanillosmopsis arborea* Barker (Asteraceae) and its major constituent, α -bisabolol. *Microbial Pathogenesis*, v. 125, p. 144–149, 2018.

SADDIQ, A.A.; KHAYYAT, S.A. Chemical and antimicrobial studies of

monoterpene: Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 98, p. 89–93, 2010.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.;

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

SCARIOT, F.J.; PANSERA, M.S.; DELAMARE, A.P.L.; ECHEVERRIGARAY, S.

Citral and geraniol induce necrotic and apoptotic cell death on *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 42, 2021.

SHARIFI-RAD, M.; VARONI, E.M.; IRITI, M.; MARTORELL, M.; SETZER, W.N.;

DEL MAR CONTRERAS, M.; SALEHI, B.; SOLTANI-NEJAD, A.; RAJABI, S.; TAJBAKHSH, M.; SHARIFI-RAD, J. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, v. 32, p. 1675–1687, 2018.

SHENDURSE, A.M.; SANGWAN, R.B.; KUMAR, A.; RAMESH, V.; PATEL, A.C.; GOPIKRISHNA, G.; ROY, S.K. Phytochemical screening and antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) leaves essential oil. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 10, p. 445–449, 2021.

SHI, C.; SONG, K.; ZHANG, X.; SUN, Y.; SUI, Y.; CHEN, Y.; JIA, Z.; SUN, H.; SUN, Z.; XIA, X. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. *PLoS ONE*, v. 11, v. 1–12, 2016.

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

SUTILI, F.J.; KREUTZ, L.C.; FLORES, F.C.; DA SILVA, C.D.B.; KIRSTEN, K.S.; VOLOSKI, A.P.D.S.; FRANDOLOSO, R.; PINHEIRO, C.G.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Effect of dietary supplementation with citral-loaded nanostructured systems on innate immune responses and gut microbiota of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Journal of Functional Foods*, v. 60, p. 103454, 2019.

TEIXEIRA, R.R.; SOUZA, R.C.; SENA, A.C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Aloysia triphylla* is effective in Nile tilapia transport. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 44, p. 17–24, 2018.

VITANZA, L.; MACCELLI, A.; MARAZZATO, M.; SCAZZOCCHIO, F.; COMANDUCCI, A.; FORNARINI, S. *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicina. *Microbial Pathogenesis*, v. 126, p. 323–331, 2018.

WEI, L.S.; WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 5, p. 147–152, 2013.

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

ZANETTI, M.; TERNUS, Z.; DALCANTON, F.; DE MELLO, M.; DE OLIVEIRA, D.; ARAUJO, P.; RIELLA, H.; FIORI, M. Microbiological characterization of pure geraniol and comparison with bactericidal activity of the cinnamic acid in gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, v. 7, p. 186–193, 2015.

CAPÍTULO 2

Óleo essencial de *Lippia sidoides* na dieta de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*): desempenho, variáveis hematológicas e bioquímicas e enzimas intestinais

Óleo essencial de *Lippia sidoides* na dieta de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*): desempenho, variáveis hematológicas e bioquímicas e enzimas intestinais

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação dietética de óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELS) em relação ao desempenho de crescimento, variáveis hematológicas e bioquímicas e enzimas digestivas em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Cinco dietas com níveis crescentes de OELS foram avaliadas (0,0 (grupo controle); 0,25; 0,50; 1,00 e 1,50 mL kg dieta⁻¹) por 60 dias. Carvacrol foi o composto químico majoritário (44,50%). A suplementação de 0,50 mL OELS kg dieta⁻¹ promoveu melhoria nas variáveis de desempenho e aumentou os valores de hematócrito, taxa de hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média, glicose plasmática, glicogênio hepático e muscular dos juvenis. Dietas suplementadas com 1,00 e 1,50 mL de OELS kg dieta⁻¹ aumentaram os níveis de triglicérides, albumina, lisozima e alanina aminotransferase (ALT) plasmática, além de atividade das enzimas intestinais amilase e lipase em tambaqui. O aumento dos níveis de OELS na dieta dos peixes reduziu a atividade da protease alcalina intestinal. Em conclusão, a inclusão de 0,50 a 1,00 mL OELS kg dieta⁻¹ demonstrou melhorar ganho de crescimento, metabolismo, parâmetros hematológicos e atividade de lisozima plasmática e das enzimas intestinais amilase e lipase em juvenis de tambaqui.

Palavras-chave: carvacrol, ganho de crescimento, parâmetros hematológicos, lisozima, suplementação dietética.

Essential oil from *Lippia sidoides* in the diet of juveniles of tambaqui (*Colossoma macropomum*): performance, hematological and biochemical variables, and intestinal enzymes

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of dietary supplementation of essential oil from *Lippia sidoides* (EOLS) in relation to growth performance, hematological and biochemical variables, and digestive enzymes in tambaqui juveniles (*Colossoma macropomum*). Five diets with increasing levels of EOLS were evaluated (0.0 (control group), 0.25, 0.50, 1.00, and 1.50 mL kg diet⁻¹) for 60 days. Carvacrol was the major chemical compound (44.50%). Supplementation of 0.50 mL OELS kg diet⁻¹ promoted improvement in growth performance variables and increased hematocrit, hemoglobin rate, mean corpuscular hemoglobin concentration, plasma glucose, liver and muscle glycogen values in juveniles. Diets supplemented with 1.00 and 1.50 mL EOLS kg diet⁻¹ increased plasma triglyceride, albumin, lysozyme and alanine aminotransferase (ALT) levels, in addition to intestinal amylase and lipase enzyme activity in tambaqui. Increasing EOLS levels in fish diets reduced intestinal alkaline protease activity. In conclusion, the inclusion of 0.50 to 1.00 mL OELS kg diet⁻¹ has been shown to improve growth gain, metabolism, hematological parameters, and plasma lysozyme and intestinal amylase and lipase enzyme activity in tambaqui juveniles.

Keywords: carvacrol, growth gain, hematological parameters, lysozyme, dietary supplementation.

INTRODUÇÃO

A aquicultura fornece alimentos nutritivos para a humanidade e gera oportunidades de emprego que contribuem para o crescimento econômico e social da população (Subasinghe et al., 2009). Ela é caracterizada principalmente por sistemas de produção intensivos e superintensivos. Em várias regiões do mundo, condições de adensamento e práticas inadequadas de manipulação são comuns nestes sistemas de cultivo (Valadão et al., 2016; Lopes et al., 2018) e podem prejudicar o crescimento e bem-estar das espécies aquáticas. Portanto, com o manejo preventivo da saúde por meio de práticas alimentares, os peixes podem utilizar preferencialmente a energia para o crescimento e reduzir a utilização de energia biológica destinada a outras funções, tais como reparo tecidual e reestabelecimento da homeostase (Gholipourkanani et al., 2017; Sutili et al., 2018; De Souza et al., 2019a,b, Chung et al., 2021a,b).

O tratamento dietético é a maneira preferida para a administração de produtos terapêuticos aos peixes, gerando benefícios à saúde em exemplares de todas as faixas de tamanho e fases da vida (Brasil et al., 2019), o que contribuiu para a melhora de seu metabolismo e crescimento. Neste sentido, produtos derivados de plantas, como óleos essenciais, quando incorporados a dietas de peixes podem fornecer compostos bioativos com capacidade de apresentar benefícios para variáveis hematológicas e bioquímicas (Bulfon et al., 2015), bem como para promoção de crescimento (Sutili et al., 2018). Além disso, são produtos biodegradáveis sem efeitos colaterais em peixes (Klatte et al., 2017; De Souza et al., 2019a, b). Estudos prévios com estes compostos já demonstraram que eles atuam como promotores de crescimento, melhoram o

aproveitamento de alimentos e o estado de saúde, aumentam a resposta imune e a capacidade antioxidante dos tecidos e apresentam efeitos antimicrobianos nestes animais (Al-Sagheer et al., 2017; Zeppenfeld et al., 2017; De Souza et al., 2019a, b; Lopes et al., 2019; Chung et al., 2021a, b). Assim, o uso de óleos essenciais como aditivos na alimentação de peixes é uma alternativa promissora para a nutrição de peixes.

Popularmente conhecido como alecrim-pimenta, alecrim de vaqueiro ou alecrim-grande, *Lippia sidoides* (Cham. (syn. *L. origanoides*)) (Verbenacea) é uma planta comumente encontrada na região semiárida do nordeste do Brasil. O gênero *Lippia* spp. tem interesse farmacológico devido aos seus compostos químicos que apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante, antisséptica, antimicrobiana, antiparasitária e anestésica em peixes (Monteiro et al., 2007; Veras et al., 2014; Guimarães et al., 2015; Soares et al., 2016, 2017; Ventura et al., 2019, Felix e Silva et al., 2022). Benefícios do uso do óleo essencial de *L. sidoides* (OELS) como antimicrobiano (*in vitro*) (Marco et al., 2012; Felix e Silva et al., 2022), anti-helmíntico em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Hashimoto et al., 2016) e promotor de crescimento em carpa comum (*Cyprinus carpio*) (Brasil et al., 2019) já foram relatados em estudos prévios.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie nativa da Bacia Amazônica de hábito alimentar onívoro que apresenta potencial de produção devido a sua rusticidade, adaptação a dietas artificiais, reprodução em cativeiro e rápido crescimento (Rodrigues et al., 2018; Souza et al., 2022). Trata-se da segunda espécie mais produzida no Brasil (18.2%), sendo que em 2020 foram produzidas mais de 10 mil ton desta espécie (IBGE, 2020). Portanto, de acordo com os resultados positivos já relatados para peixes alimentados com dietas

suplementadas com óleos essenciais contendo *Lippia* spp., inclusive OELS, este estudo objetivou avaliar o efeito do OELS como promotor de crescimento e bem-estar (variáveis hematológicas e metabólicas e atividade de enzimas digestivas) para juvenis de tabaqui.

MATERIAL E MÉTODOS

Óleo essencial de Lippia sidoides

Exemplares de *L. sidoides* foram cultivados na região nordeste do Brasil no setor de plantas medicinais do Instituto Federal Sertão Pernambucano – Zona Rural (IF Sertão PE), Petrolina, PE. Amostras da planta foram coletadas em março de 2018. O OELS (densidade de 0,91 g mL⁻¹) foi extraído de folhas frescas das plantas por hidrodestilação usando um aparato tipo clewenger durante 2 h (European Pharmacopeia, 2007) no Laboratório de Produtos Naturais do IF Sertão PE.

A determinação da composição química do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/EM) no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamento da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil. A análise de CG/EM foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (Shimadzu Coporation, Kyoto, Japão), e as condições utilizadas foram: coluna DB-5MS (Agilent technologies; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); gás hélio (99,999%) como gás carregador a um fluxo constante de 1,1 mL min⁻¹; volume de injeção de 1,0 µL com proporção de divisão do injetor de 1:10 a uma temperatura de 250 °C; modo de impacto de elétrons a 70 eV;

temperatura das fontes de íons a 280 °C e temperatura da linha de transferência a 260 °C. A temperatura do forno foi programada para 60 °C, com aumento progressivo de 3 °C por minuto até alcançar 240 °C. Uma mistura de hidrocarbonetos lineares (C₈H₁₈ – C₂₀H₄₂) foi injetada nas mesmas condições experimentais.

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi realizada pela comparação dos espectros obtidos com os do banco de dados do equipamento (NIST, 2010) e pelo índice de retenção de Kovats. Os dados foram adquiridos e processados em PC com o software Shimadzu GC-MS Solution (Shimadzu Corporation). Após a extração, o OELS foi estocado em frasco âmbar a - 4 °C. Os principais constituintes de OELS foram Carvacrol (44,50%), Cymene (14,06%) e γ -Terpinene (12,43%) (dados publicados no Cap 1).

Procedimento experimental

Os juvenis de tambaqui foram obtidos da estação de piscicultura de Bebedouro - Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF), Petrolina, PE, Brasil. Foram utilizados 300 peixes (45,89 \pm 0,19 g) distribuídos em 20 caixas de 500 L com aeração constante em um sistema de recirculação com filtro mecânicos e biológico no Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, PE, Brasil. Os animais passaram por um período de aclimação de 15 dias, onde receberam dieta comercial (28% de proteína bruta; Irca, Carpina, Brazil) até a saciedade aparente duas vezes por dia (08:00 e 16:00 h). O experimento teve duração de 60 dias. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Vale do São Francisco (N°

0017/280820).

O desenho experimental foi completamente aleatório e composto por cinco tratamentos e quatro repetições. Foram formuladas cinco dietas extrusadas, perfazendo os seguintes tratamentos: 0,00 (controle), 0,25, 0,50, 1,00 ou 1,50 mL kg dieta⁻¹ (adaptado de De Souza et al., 2019b). Os ingredientes (Tabela 1) foram moídos, pesados e homogeneizados em misturador industrial por 20 min (Inbramaq, modelo AM25, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A mistura foi moída em peneira (1 mm) e posteriormente extrusada com a matriz (placa matriz de 0.5 mm) e em seguida seca em estufa de circulação forçada a 55 °C por 24 h. Em seguida, o OELS foi adicionado a mistura junto com o óleo de soja (veículo), seguido de adição de água. Os peletes foram fracionados em tamanhos compatíveis com o tamanho da boca dos juvenis.

As dietas foram armazenadas sob refrigeração (-20 °C) em recipientes de vidro fechados hermeticamente. Os peixes receberam a dieta experimental duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 h) até a saciedade aparente por 60 dias. O consumo de dieta foi mensurado a cada três dias, e cada tanque tinha seu próprio recipiente da dieta. Antes do fornecimento da alimentação, as embalagens contendo as dietas eram pesados e, então, era anotado o peso. Ao final da última alimentação do terceiro dia, os potes eram pesados novamente para aferir o consumo de cada unidade experimental. Os indivíduos foram submetidos a jejum de 24 h antes do início do experimento e da biometria e coleta de amostras.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais fornecidas ao tambaqui.

Ingredientes^a	g kg⁻¹
Farelo de soja	520
Farelo de milho	255
Farelo de trigo	100
Farinha de peixe	97,5
Óleo de soja	8,5
NaCl	5,0
Fosfato bicálcico	5,0
Vitaminas e minerais (premix) ^b	5,0
Vitamina C	2,0
Propionato de cálcio	2,0
Composição aproximada	
Teor de matéria seca	980
Proteína Bruta	369
Extrato Etéreo	30
Fibra bruta	35
Matéria mineral	90
Energia Digestível (k cal ⁻¹)	4.100

^a Farinha de soja, farelo de milho, farelo de trigo, fosfato bicálcico, vitamina C e propionato de cálcio: Pratigi Alimentos®, Castro Alves, BA, Brasil; farinha de peixe (obtidos de aparas e miudezas remanescentes de peixes processados para consumo humano): Nutrivil Nutrição Animal®, Caruaru, PE, Brasil; óleo de soja: Bunge Alimentos S.A., Ipojuca, PE, Brasil. ^b Premix de vitaminas e minerais (níveis garantidos por kg de produto) - ácido fólico: 1200 mg; ácido nicotínico: 20 g; BHT: 5 mg; vitamina A: 2400 UI; vitamina D3: 600 UI; vitamina E: 30 UI mg; vitamina K3: 3 mg; vitamina C: 60 g; ácido pantotênico: 10 mg; biotina: 200 mg; colina: 100 g; inositol: 25 g; vitamina B1: 4 mg; vitamina B2: 4 mg; vitamina B12: 8 µg; vitamina B2: 4 mg; vitamina B6: 3 mg; CO: 80 mg; Fe: 10 g; Se: 100 mg; Cu: 3500 mg; Mn: 10 mg; Zn: 24 mg; I: 160 mg.

Os tanques foram limpos diariamente por sifonagem para remover fezes e possíveis sobras de ração. As perdas de água por evaporação e ou limpeza dos tanques foram repostas com água nas mesmas condições existentes nos tratamentos experimentais. Os parâmetros de qualidade de água se mantiveram estáveis durante o período experimental. Os parâmetros físico-químicos da água: pH (pHmetro digital, Hanna HI 98130, Barueri, SP, Brasil), temperatura e oxigênio dissolvido (Oxímetro digital Aquatec MO-900, São Paulo, SP, Brasil) foram mensurados diariamente; amônia total, fósforo e nitrato (Kit Alfatecnoquímica, Florianópolis, SC, Brasil) foram mensurados semanalmente. Durante o experimento, a qualidade de água foi mantida em pH ($6,5 \pm 0,33$), temperatura ($25,5 \pm 0,50$ °C), oxigênio dissolvido ($6,50 \pm 0,40$ mg L⁻¹), amônia total ($0,24 \pm 0,08$ mg L⁻¹), amônia não ionizada ($0,43$ µg L⁻¹ N-NH₃), alcalinidade total ($50 \pm 0,00$ mg L⁻¹ CaCO₃), fósforo $0,38 (\pm 0,03)$ mg L⁻¹ e nitrito ($0,49 \pm 0,33$ mg L⁻¹).

Desempenho de crescimento

Ao final do experimento foram analisadas as seguintes variáveis de desempenho de crescimento através das seguintes fórmulas:

- Ganho de peso = peso corporal final – peso corporal inicial;
- Taxa de crescimento específico (TCE) = $100 \times (\ln \text{ do peso final} - \ln \text{ do peso inicial}) / \text{dias de experimento}$;
- Taxa de conversão alimentar aparente (CAA) = consumo alimentar/ganho em peso;
- Sobrevivência = $(\text{número de peixes final} \times 100) / \text{número de peixes inicial}$.

Coleta de amostras e análises

Após 60 dias, três animais por caixa (n = 12 animais por tratamento) foram aleatoriamente selecionados para a coleta das amostras de sangue, fígado e intestino. Os animais retirados dos tanques foram anestesiados com cloridrato de benzocaína (30 ppm) e logo após foi coletado o sangue (1 mL) por punção da veia caudal com auxílio de seringas heparinizadas. Após a coleta de sangue, os animais foram finalizados com uma dose letal de cloridrato de benzocaína (100 ppm) seguido de secção da medula espinhal. Logo após, foram coletados fígado e intestino dos animais.

O sangue foi dividido para a realização das análises hematológicas (0,5 mL) e plasmáticas (1,0 mL). As amostras foram transferidas para capilares heparinizados e centrifugadas a 4 °C a 12.000 x g por 5 min para a determinação do hematócrito (Hct) pelo método descrito por Goldenfarb et al. (1971). A concentração de hemoglobina foi realizada conforme descrita por Drabkin (1948) pelo método de cianometahemoglobina com auxílio de espectômetro e leitura realizada a 540 nm. A contagem de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer, com auxílio do reagente de Natt & Herrick (1952). As variáveis hematimétricas de hemoglobina corpuscular média (HCM), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram estimadas conforme descrito por Wintrobe (1934).

A segunda alíquota de sangue foi centrifugada a 4 °C a 3.000 x g (15 min) para obtenção do plasma. Em seguida, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a - 20 °C. A determinação plasmática de glicose, proteínas totais, albumina, triglicerídeos e alanina aminotransferase (ALT) foram realizadas

usando kits comerciais (Labtest® kits; Vista Alegre, MG, Brasil) e um analisador bioquímico semi-automático (Doles®, modelo D250, Goiânia, GO, Brasil). A atividade da lisozima plasmática ($\mu\text{g mL}^{-1}$) foi medida usando um ensaio turbidimétrico, conforme descrito em detalhes por De Souza et al. (2019b).

As amostras de músculo, fígado e trato intestinal total foram coletadas e preservadas em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises. Posteriormente, para análise de enzimas intestinais, 100 mg das amostras de tecidos foram homogeneizadas em tampão (fosfato 10 mM/20 mM tris-pH 7,0) usando um homogeneizador mecânico (Marconi MA039, Piracicaba, SP, Brasil). Logo após as amostras foram centrifugadas a $600 \times g$ por 3 min a 4°C . O sobrenadante foi novamente centrifugado a $6000 \times g$ por 8 min a 4°C . A atividade das enzimas intestinais amilase e lipase foram determinadas por espectrofotometria a 405 nm usando os kits comerciais (Labtest®). A atividade inespecífica da protease intestinal foi determinada de acordo com Walter (1984).

Para determinação do glicogênio muscular e hepático, outra amostra de cada tecido (100 mg) foi incubada em 1 mL de KOH (6N) a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min. Em seguida, 250 μL de etanol e 100 μL de K_2SO_4 (10%) foram adicionados a uma alíquota da amostra. Logo após, a amostra foi centrifugada a $3000 \times g$ durante 3 min em temperatura ambiente. Posteriormente, o precipitado foi ressuspenso em 2 mL de água destilada. Em seguida, 100 μL da amostra, 250 μL de fenol e 1 mL de H_2SO_4 foram transferidos para uma cubeta e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 480 nm (Bidinotto et al., 1997).

Análises estatística

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. O teste

de Levene's confirmou a homocedasticidade de variação dos dados. Os efeitos do OELS foram avaliados com base na regressão polinomial. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram analisadas pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$. Para realizar as análises de regressão, foram considerados os valores encontrados para todas as repetições.

RESULTADOS

Foram observados efeito quadrático para as variáveis peso final ($y = 2358,299 + (301,967x) - (244,521x^2)$; $R^2 = 0,90$), ganho de peso ($y = 27,852 + (4,901x) - (3,944x^2)$; $R^2 = 0,90$), CAA ($y = 1,316 - (0,303x) + (0,220x^2)$; $R^2 = 0,71$) e TCE ($y = 2,733 + (0,269x) - (0,210x^2)$; $R^2 = 0,87$), indicando um melhor desempenho de crescimento nos peixes que receberam 0,50 mL OELS kg dieta⁻¹. Em adição, CAA apresentou valores significativamente menores nos grupos que receberam 0,25 e 0,50 mL OELS kg dieta⁻¹ quando comparado com os peixes do grupo controle ou alimentados com 1,50 mL OELS kg deita⁻¹ ($p < 0,049$). O peso inicial e a sobrevivência dos juvenis não diferiram entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Desempenho de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELS).

Variáveis	OELS (mL kg dieta ⁻¹)				
	0,00	0,25	0,50	1,00	1,50
Peso inicial	45,84 ± 0,30	45,85 ± 0,40	45,97 ± 0,06	45,89 ± 0,15	46,21 ± 0,55
Peso final	158,76 ± 5,02	161,63 ± 4,18	165,19 ± 2,64	158,89 ± 2,14	151,50 ± 3,40

Ganho de peso	112,92 ± 5,23	115,78 ± 4,57	119,22 ± 2,62	113,00 ± 2,16	105,29 ± 2,94
CAA	1,35 ± 0,04 ^a	1,19 ± 0,01 ^b	1,23 ± 0,01 ^b	1,25 ± 0,02 ^{ab}	1,35 ± 0,02 ^a
TCE	2,72 ± 0,13	2,80 ± 0,09	2,84 ± 0,04	2,76 ± 0,04	2,68 ± 0,06
Sobrevivência	98,33 ± 1,67	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00

Peso inicial e final e ganho de peso são expressos em g. TCE (Taxa de crescimento específico) é expressa em % dia⁻¹. Sobrevivência é expressa em %. CAA = Conversão alimentar aparente. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão (n = 4 tanques por tratamento). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (teste de Tukey, p < 0,05). Foi verificada regressão quadrática para peso final, ganho de peso e TCE.

A análise das variáveis hematológicas demonstrou que eritrócitos ($y = 3,800 + (0,172x) - (0,360x^2)$; $R^2 = 0,69$), hematócrito ($y = 31,235 + (1,859x) - (1,907x^2)$; $R^2 = 0,68$), taxa de hemoglobina ($y = 9,819 + (3,466x) - (2,023x^2)$; $R^2 = 0,66$) e CHCM ($y = 3,144 + (0,901x) - (0,429x^2)$; $R^2 = 0,80$) apresentaram um efeito quadrático em função dos níveis de OELS, onde os maiores valores foram verificados com a inclusão de 0,50 mL OELS kg dieta⁻¹. Foi observado efeito linear positivo em VCM ($y = 83,233 + (7,777x)$; $R^2 = 0,71$) e HCM ($y = 27,445 + (4,598x)$; $R^2 = 0,91$) (Tabela 3).

Além disso, em relação ao hematócrito, o grupo que recebeu 0,50 mL de OELS kg dieta⁻¹ apresentou valores significativamente superiores ao grupo que recebeu 1,50 mL de OELS kg dieta⁻¹ (p < 0,014). Foi verificado que a taxa de hemoglobina foi significativamente inferior no grupo controle quando comparada aos grupos que receberam 0,25 e 0,50 mL OELS kg dieta⁻¹ (p < 0,047). Os peixes do grupo controle apresentaram CHCM significativamente inferior aos grupos que receberam dietas suplementadas com OELS (p < 0,044) (Tabela 3).

Tabela 3. Variáveis hematológicas de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELS).

Variáveis	OELS (mL kg dieta ⁻¹)				
	0,00	0,25	0,50	1,00	1,50
Eri	3,77 ± 0,19	3,74 ± 0,18	4,04 ± 0,17	3,42 ± 0,22	3,31 ± 0,22
Hct	31,17 ± 0,68 ^{ab}	31,25 ± 0,30 ^{ab}	32,50 ± 0,56 ^a	30,58 ± 0,68 ^{ab}	29,92 ± 0,43 ^b
Hg	9,53 ± 0,42 ^b	10,81 ± 0,28 ^a	11,44 ± 0,30 ^a	10,71 ± 0,30 ^{ab}	10,66 ± 0,28 ^{ab}
VCM	85,43 ± 5,25	85,87 ± 4,37	81,96 ± 3,45	93,66 ± 6,04	94,86 ± 6,74
HCM	26,31 ± 2,23	29,47 ± 1,26	28,98 ± 1,55	32,79 ± 2,16	33,62 ± 2,19
CHCM	3,06 ± 0,13 ^b	3,46 ± 0,09 ^a	3,52 ± 0,08 ^a	3,51 ± 0,09 ^a	3,57 ± 0,09 ^a

Eri (Eritrócitos) é expresso em $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, Hct (Hematócrito) é expresso em %, Hg (Hemoglobina) e CHCM (concentração média de hemoglobina corpuscular) são expressos em g dL^{-1} , VCM (volume corpuscular médio) é expresso em fL e HCM (hemoglobina corpuscular média) é expresso em pg. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão ($n = 12$ peixes por tratamento). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (teste de Tukey, $p < 0,05$). VCM e HCM apresentaram regressão linear e as demais variáveis apresentaram regressão quadrática.

Efeito linear positivo demonstrou que a suplementação de OELS aumentou os níveis de triglicérides ($y = 185,859 + (62,324x)$; $R^2 = 0,87$), albumina ($y = 0,534 + (0,308x)$; $R^2 = 0,77$), ALT ($y = 25,822 + (0,265x)$; $R^2 = 0,78$) e lisozima plasmática ($y = 0,035 + (0,022x)$; $R^2 = 0,91$). Efeito linear negativo foi verificado

entre a suplementação de OELS e os níveis de proteínas totais plasmáticas ($y = 2,338 - (0,241x)$; $R^2 = 0,90$). Também foi observado um efeito quadrático entre a suplementação de OELS e os níveis de glicose plasmática ($y = 95,792 + (16,896x) - (12,057x^2)$; $R^2 = 0,95$), glicogênio hepático ($y = 91,756 + (109,614x) - (53,737x^2)$; $R^2 = 0,92$) e glicogênio muscular ($y = 38,863 + (54,326x) - (28,670x^2)$; $R^2 = 0,67$) onde os maiores valores ocorrem nos tratamentos entre 0,50 e 1,00 OELS kg^{-1} para glicose plasmática e entre 0,50 e 1,50 OELS kg^{-1} para glicogênio hepático e muscular (Tabela 4).

Os valores de proteínas totais e triglicérides plasmáticos foram significativamente maiores e menores, respectivamente, nos peixes pertencentes ao grupo controle e alimentados com 0,25 mL OELS $\text{kg} \text{dieta}^{-1}$ do que aqueles que foram suplementados com 1,00 e 1,50 mL OELS $\text{kg} \text{dieta}^{-1}$ ($p < 0,035$ e $< 0,037$, respectivamente). A albumina plasmática apresentou valores significativamente menores nos peixes que receberam 0,00 ou 0,25 mL OELS $\text{kg} \text{dieta}^{-1}$ em relação aos juvenis dos demais tratamentos ($p < 0,001$). Os peixes do grupo controle tiveram um valor de albumina plasmática inferior aos juvenis do grupo 0,25 mL OELS $\text{kg} \text{dieta}^{-1}$ ($p < 0,023$). Os níveis de lisozima plasmática foram significativamente superiores nos grupos que receberam 1,50 ou 2,00 mL OELS $\text{kg} \text{dieta}^{-1}$ quando comparado aos tambaquis que receberam 0,00 ou 0,50 mL OELS $\text{kg} \text{dieta}^{-1}$ ($p < 0,036$). Os valores de glicogênio hepático nos indivíduos do grupo controle foram significativamente inferiores àqueles que receberam entre 0,50 e 1,50 mL OELS $\text{kg} \text{dieta}^{-1}$ ($p < 0,002$). O glicogênio muscular no grupo controle apresentou valores significativamente menores em relação ao grupo alimentado com 0,50 mL OELS $\text{kg} \text{dieta}^{-1}$ ($p < 0,033$) (Tabela 4).

Tabela 4. Variáveis metabólicas de juvenis de tambaqui alimentados com dietas suplementadas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELS).

Variáveis	OELS (mL kg dieta ⁻¹)				
	0,00	0,25	0,50	1,00	1,50
Plasmáticas					
Glicose	96,46 ± 5,84	98,17 ± 4,75	101,27 ± 5,15	101,27 ± 2,15	93,75 ± 4,25
Trigl	185,78 ± 20,77 ^b	185,37 ± 14,95 ^b	228,61 ± 21,22 ^{ab}	265,42 ± 15,89 ^a	266,67 ± 18,62 ^a
Prot tot	2,33 ± 0,06 ^a	2,31 ± 0,06 ^a	2,23 ± 0,08 ^{ab}	2,02 ± 0,07 ^b	2,02 ± 0,05 ^b
Albumina	0,44 ± 0,04 ^c	0,59 ± 0,05 ^b	0,86 ± 0,03 ^a	0,83 ± 0,02 ^a	0,95 ± 0,03 ^a
ALT	25,92 ± 4,07	25,84 ± 3,63	25,91 ± 2,62	26,00 ± 2,78	26,30 ± 3,38
Lisozima	0,04 ± 0,01 ^b	0,04 ± 0,01 ^b	0,04 ± 0,01 ^b	0,07 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^a
Teciduais					
Glic hepática	87,76 ± 7,20 ^b	118,11 ± 7,60 ^{ab}	140,79 ± 9,86 ^a	138,53 ± 11,99 ^a	138,40 ± 7,02 ^a
Glic muscular	38,85 ± 4,37 ^b	45,21 ± 6,21 ^{ab}	69,09 ± 8,98 ^a	57,65 ± 9,16 ^{ab}	57,83 ± 5,04 ^{ab}

Glicose, Trigl (Triglicérides), Albumina e Glic (Glicogênio) são expressos em mg dL⁻¹, ALT (alanina aminotransferase) é expressa em U L⁻¹, Prot tot (Proteínas totais) é expressa em g dL⁻¹, e Lisozima é expressa em µg mL⁻¹. Os dados são apresentados como média ± erro padrão (n = 12 peixes por tratamento). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (teste de Tukey, p < 0,05). As variáveis metabólicas apresentaram regressão linear, exceto glicose plasmática, glicogênio hepático e glicogênio muscular que apresentaram regressão quadrática.

Efeito linear positivo demonstrou que a suplementação de OELS aumentou a atividade de amilase intestinal ($y = 201,750 + (8,222x)$; $R^2 = 0,84$) e

reduziu a atividade da protease alcalina ($y = 0,306 - (0,0331x)$; $R^2 = 0,92$). Um efeito quadrático foi verificado para a atividade de lipase intestinal ($y = 0,420 - (0,050x) + (0,058x^2)$; $R^2 = 0,82$).

Tabela 5. Atividade das proteínas intestinais (UI mg protein⁻¹) de juvenis de tambaqui alimentados com dietas suplementadas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELS).

Variáveis	OELS (mL kg dieta ⁻¹)				
	0,00	0,25	0,50	1,00	1,50
Amilase	203,17 ± 7,83	203,37 ± 7,00	205,96 ± 6,36	206,60 ± 6,05	216,37 ± 7,95
Lipase	30,50 ± 1,06	29,75 ± 1,08	30,19 ± 0,90	31,60 ± 1,00	29,10 ± 1,10
Prot alc	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,26 ± 0,02

Os dados são apresentados como média ± erro padrão (n = 12 peixes por tratamento). Amilase e protease alcalina (Prot alc) apresentaram regressão linear e Lipase apresentou regressão quadrática.

DISCUSSÃO

No presente estudo, carvacrol (44,50%) foi o composto majoritário de OELS, demonstrando que este composto (ou uma combinação de carvacrol com outros compostos) pode ter contribuído com uma melhor performance de crescimento nos juvenis de tambaqui alimentados com 0,50 mL OELS kg dieta⁻¹. Tal crescimento pode ter sido influenciado pelas propriedades antioxidantes e antimicrobianas e de reforço no sistema imune do carvacrol (Zheng et al., 2009; Giannenas et al., 2012). Similarmente, De Souza et al. (2019b), verificou que o uso do óleo essencial de *Lippia alba* (2,0 mL kg dieta⁻¹, linalool como composto

majoritário) contribuiu com o aumento de crescimento em tilápia do Nilo. Outros estudos prévios verificaram que o uso de carvacrol (12,0 g kg⁻¹ ou 2,0-3,0 g kg⁻¹ em combinação com thymol) atuou como promotor de crescimento em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Zheng et al., 2009; Ahmadifar et al., 2011; Giannenas et al., 2012).

O efeito promotor de crescimento também é influenciado pela ativação de enzimas digestivas, uma vez que os compostos ativos de origem vegetal podem promover maior secreção destas enzimas (Srinivasan, 2005). Os resultados do corrente estudo demonstraram que a suplementação com OELS estimulou a função digestiva dos peixes, aumentando a atividade de lipase e amilase intestinal. De forma similar, a suplementação alimentar com óleo essencial de orégano (*Origanum onites*) (carvacrol e thymol como compostos majoritários) apresentou efeitos positivos na secreção de enzimas digestivas em carpa comum (Zhang et al., 2020). Em adição, Giannenas et al. (2012) informaram que promotores de crescimento presentes em óleos essenciais atuam presumivelmente na microbiota intestinal e levam a um melhor desempenho de peixes. Além disso, a suplementação alimentar com óleos essenciais possui propriedades aromáticas que podem estimular o apetite em peixes (Ching et al., 2021a), com consequente efeito positivo para a taxa de crescimento.

Além das enzimas digestivas, as variáveis hematológicas também podem ser utilizadas como indicadores de status nutricional, bem como de avaliação de metabolismo (Basusta, 2005; Fazio, 2019; De Souza et al., 2019a). Neste estudo, a suplementação dietética de OELS (0,50 a 1,00 mL kg dieta⁻¹) promoveu o aumento da hemoglobina e da CHCM, resultando em uma maior capacidade de transporte de oxigênio, uma vez que esta é a principal proteína do sangue

responsável pelo carreamento de oxigênio (Tavares-Dias, 2015). Estas variáveis quando acompanhados de uma redução no número de eritrócitos demonstram que as células passam por alterações fisiológicas, onde o aumento do VCM e HCM irá contribuir para o transporte de oxigênio até os tecidos (Oba-Yoshioka et al., 2017), conforme reportado no corrente estudo.

Em adição, o valor de hematócrito foi maior nos peixes suplementados com 0,50 mL OELS kg dieta⁻¹, o que sugere que esta concentração (ou até mesmo 1,00 mL OELS kg dieta⁻¹) possa ter auxiliado em um aumento da capacidade de transporte de oxigênio, com conseqüente melhoria do metabolismo e manutenção do sistema imune (Kesbiç et al., 2020; Acar et al., 2019; De Souza et al., 2019b). Similarmente, Mohamadi Saei et al. (2016) verificaram aumento da taxa de hematócrito em truta arco-íris após a suplementação dos óleos essenciais de murta (*Myrtus communis*) e satureja (*Satureja khuzistanica*) (80,60% de carvacrol). No entanto, em outros estudos isso não foi verificado, uma vez que a suplementação de carvacrol ou de ingredientes que contenham carvacrol não promoveram alterações nas variáveis hematológicas em truta arco-íris (Ahmadifar et al., 2011), robalo (*Discentrarchus labrax*) (Yilmaz et al., 2014) e jundiá (*Rhamdia quelen*) (Dos Santos et al., 2017).

Outro importante achado do corrente estudo foi em relação ao aumento no metabolismo (triglicérides e ALT plasmáticos e glicogênio hepático e muscular) dos tambaquis que receberam suplementação entre 0,50 a 1,50 mL OELS kg dieta⁻¹. A enzima ALT está localizada principalmente nas células do coração, fígado e rins e sua atividade pode ser moduladas de acordo com a composição da dieta, sendo comumente utilizadas para avaliar o estado de saúde do fígado (Zeppenfeld et al., 2017). No presente estudo, ALT plasmático

não deve ser indicativo de danos hepáticos, pois embora esta enzima tenha aumentado proporcionalmente em relação a inclusão de OELS na dieta, os valores encontrados foram muito próximos aos registrados em tambaquis do grupo controle. Esta enzima deve ter contribuído com o aumento das reservas metabólicas, pois ela desempenha um importante papel nos processos de transaminação e desaminação, catabolizando aminoácidos em glicose, onde os esqueletos de carbono dos aminoácidos podem ser utilizados pela via do ácido cítrico (principal via da homeostase de glicose) para manutenção do suprimento de glicose (Roques et al., 2020).

Adicionalmente, a suplementação de carvacrol na dieta é conhecida por melhorar a emulsificação e transporte de lipídios, o que resulta em maior disponibilidade e absorção das triglicérides plasmáticas (Yilmaz et al., 2015). Os níveis de triglicérides do plasma podem ser utilizados como indicador da função hepática, uma vez que este metabolito é sintetizado no fígado e transportado para ser armazenado nos tecidos, atuando no fornecimento de energia, além de ser um importante componente estrutural da membrana celular (Yilmaz et al., 2015; Brum et al., 2018). Assim, neste estudo, a suplementação dietética de OELS em tambaquis pode ter promovido um aumento das reservas de energia na forma de carboidratos no músculo e no fígado. Similarmente ao presente estudo, Mohamadi Saei et al. (2016) verificaram o aumento do nível de triglicérides no plasma em truta arco-íris alimentados com dietas suplementadas com óleo essencial de murta (80,60% de carvavrol).

Em relação aos níveis de proteínas totais do plasma foi observado uma redução nos juvenis que receberam as maiores concentrações de OELS na dieta. Em estudo realizado com robalo, Volpati et al. (2014) também verificaram

a redução do nível de proteínas totais plasmáticas após a suplementação de carvacrol na dieta, e relacionaram esta resposta com uma menor atividade de absorção da mucosa intestinal desencadeada pelo carvacrol. Ao contrário das proteínas totais, os níveis de albumina plasmática aumentaram nos tambaquis que foram alimentados com as dietas contendo as maiores concentrações de EOLS no corrente estudo. Uma resposta de fortalecimento do sistema imunológico é comumente relacionada ao aumento do nível de albumina plasmática (Gholipourkanani et al., 2014). Assim, a albumina plasmática tem a importante função de transportar diversos compostos, regular o pH sanguíneo e estimular o sistema imune (Mohamadi Saei et al., 2016; Yilmaz et al., 2014). Similarmente, o aumento dos níveis de albumina plasmática também foi relatado para robalo asiático (*Lates calcarifer*) e carpa comum que tiveram suplementação dietética com extrato de gengibre (Talpur et al., 2013; Mohammadi et al., 2020).

Por fim, o presente estudo verificou que a suplementação com o OELS promoveu o aumento da atividade enzimática da lisozima plasmática. Esta enzima é responsável pela ativação dos leucócitos e macrófagos, tornando os micro-organismos mais susceptíveis a fagocitose (Siwicki & Anderson, 1993). O aumento dos níveis de lisozima plasmática encontrado neste estudo deve ter sido influenciado pelo carvacrol, devido a sua capacidade de promoção de melhorias na resposta imune não específica (Zheng et al., 2009; Diler et al., 2016). Similarmente, o aumento da atividade da lisozima do plasma também foi observado em robalo e tilápia híbrida após suplementação alimentar com carvacrol (Volpatti et al., 2014; Ran et al., 2016) e em truta arco-íris e carpa comum alimentadas com dietas contendo óleo essencial de orégano (carvacrol

como um dos compostos majoritários) (Diler et al., 2017; Zhang et al., 2020).

CONCLUSÃO

O presente estudo verificou que a suplementação de 0,50 a 1,00 mL OELS kg dieta⁻¹ é indicada para juvenis de tambaqui, pois melhorou a performance de crescimento, as variáveis hematológicas e metabólicas e a atividade de lisozima plasmática e de enzimas intestinais.

REFERÊNCIAS

- ACAR, U.; KESBIÇ, O.S.; INANAN, B.E.; YILMAZ, S. Effects of dietary Bergamot (*Citrus bergamia*) peel oil on growth, haematology and immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture Research*, v. 50, p. 3305–3312, 2019.
- AHMADIFAR, E.; FALAHATKAR, B.; AKRAMI, R. Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 27, p. 1057–1060, 2011.
- AL-SAGHEER, A.A.; MAHMOUD, H.K.; REDA, F.M.; MAHGOUB, S.A.; AYYAT, M.S. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquaculture Nutrition*, v. 24, p.1006–1014,

2017.

BAŞUSTA, G.A. 2005. Fish hematology and hematological techniques. In: KARATAS, M. (Ed.) Research Techniques in Fish Biology (in Turkish), Nobel Publications, Ankara, pp. 275–300.

BIDINOTTO, P.M.; SOUZA, R.H.S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of microsamples. Boletim Tecnico do CEPTA, v. 10, p. 53–60, 1997.

BRASIL, E.M.; FIGUEREDO, A.B.; CARDOSO, L.; SANTOS, M.Q.C.; BERTAGLIA, E.A.; FURTADO, W.E.; VIANA, J.S.; DO CARMO, I.B.; CHAVES, F.C.M.; MOURIÑO, J.L.P.; MARTINS, M.L. *In vitro* and *in vivo* antiparasitic action of essential oils of *Lippia* spp. in Koi Carp (*Cyprinus carpio*) fed supplemented diets. Brazilian Journal of Veterinary Pathology, v. 12, p. 88–100, 2019.

BRUM, A.; PEREIRA, S.A.; CARDOSO, L.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; MOURIÑO, J.L.P.; MARTINS, M.L. Blood biochemical parameters and melanomacrophage centers in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger. Fish Shellfish & Immunology, v. 74, p. 444–449, 2018.

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.

CHUNG, S.; RIBEIRO, K.; MELO, J.F.B.; TEIXEIRA, D.V.; VIDAL, L.V.O.; COPATTI, C.E. Essential oil from ginger influences the growth, haematological and biochemical variables and histomorphometry of intestine and liver of Nile tilapia juveniles. *Aquaculture*, v. 534, p. 736325, 2021a.

CHUNG, S.; RIBEIRO, K.; TEIXEIRA, D.V.; COPATTI, C.E. Inclusion of essential oil from ginger in the diet improves physiological parameters of tambaqui juveniles (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture*, v. 543, p. 736934, 2021b.

DE SOUZA, E.M.; DE SOUZA, R.C.; MELO, J.F.B.; DA COSTA, M.M.; DE SOUZA, A.M.; COPATTI, C.E. Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in Nile tilapia diet: Growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. *Aquaculture*, v. 504, p. 7–12, 2019a.

DE SOUZA, R.C.; DE SOUZA, E.M.; COSTA, M.M.; MELO, J.F.B.; BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C.E. Dietary addition of the essential oil from *Lippia alba* to Nile tilapia and its effect after inoculation with *Aeromonas* spp. *Aquaculture Nutrition*, v. 25, p. 39–45, 2019b.

DILER, O.; GORMEZ, O.; DILER, I.; METIN, S. Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, v. 23, p. 844–851, 2016.

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

DRABKIN, D.L. The standardization of hemoglobina measurement. *American of the Journal Medical Sciences*, v. 215, p. 210–211, 1948.

European Pharmacopoeia. European directorate for the quality of medicines, 6th ed. European directorate for the quality of medicines, Strasbourg, Alsace, France, 2007.

FAZIO, F. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. *Aquaculture*, v. 500, p. 237–242, 2019.

GHOLIPOURKANANI H.; JAMALI F.; JAFARYAN H.; GHOLAMALIPOUR ALAMDARI E. Dietary effect of *Lippia citrodora* essential oil on some hematological, biochemical, growth performance and body composition of *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 3, p. 1–15, 2017.

GIANNENAS, I.; TRIANTAFILLOU, E.; STAVRAKAKIS, S.; MARGARONI, M.; MAVRIDIS, S.; STEINER, T. AND KARAGOUNI, E. Assessment of dietary

supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v. 350, p. 26–32, 2012.

GUIMARÃES, L.G.L.; DA SILVA, M.L.M.; REIS, P.C.J.; COSTA, M.T.; ALVES, L.L. General characteristics, phytochemistry and pharmacognosy of *Lippia sidoides*. *Natural Product Communications*, v. 10, p. 1861–1867, 2015.

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

HASHIMOTO, G.S.O.; MARINHO NETO, F.; RUIZ, M.L.; ACCHILE, M.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; MARTINS, M.L. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture*, v. 450, p. 182–186, 2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal 2020, IBGE: Rio de Janeiro. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2020_v48_br_informativo.pdf

KESBIÇ, O.S.; ACAR, Ü.; YILMAZ, S.; AYDIN, O.D. Effects of bergamot (*Citrus bergamia*) peel oil-supplemented diets on growth performance, haematology

and serum biochemical parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 46, p. 103–110, 2020.

KLATTE S., SHAEFER H.C., HEMPEL M. Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 5, p. 61–66, 2017.

LOPES, J.M.; SOUZA, C.F.; SACCOL, E.M.H.; PAVANATO, M.A.; ANTONIAZZI, A.; ROVANI, M.T.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. *Citrus x aurantium* essential oil as feed additive improved growth performance, survival, metabolic, and oxidative parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition*, v. 25, p. 310–318, 2018.

MARCO, C.A.; TEIXEIRA, E.; SIMPLÍCIO, A.; OLIVEIRA, C.; COSTA, J.; FEITOSA, J. Chemical composition and allelopathic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. *Chilean Journal of Agricultural Research*, v. 72, p. 157–160, 2012.

MOHAMADI SAEI, M.; BEIRANVAND, K.; KHALESI, M.K.; MEHRABI, F. Effects of dietary savory and myrtle essential oils on growth, survival, nutritional indices, serum biochemistry, and hematology of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fry. *Journal of World Aquaculture Society*, v. 47, p. 779–785, 2016.

MOHAMMADI, G., RASHIDIAN, G., HOSENIFAR, NASERABAD, S.S., DOAN,

H.V. Ginger (*Zingiber officinale*) extract affects growth performance, body composition, haematology, serum and mucosal immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish and Immunology*, v. 99, p. 267–273, 2020.

MONTEIRO, M.V.B.; LEITE, A.K.R.M.; BERTINI, L.M.; DE MORAIS, S.M.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 378–382, 2007.

NATT, M.P.; HERRICK, C.A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*, v. 31, p. 735–738, 1952.

NIST. NIST/EPA/NIH. Mass Spectral Library and Search/analysis Programs. Hoboken: J. Wiley and Sons. 2010. 49p.

OBA-YOSHIOKA, E.T.; COSTA, R.; BORGES, M.; TAVARES-DIAS, M. Blood variables of hybrid tambacu farmed in Amapá state, northern Brazil. *Veterinária e Zootecnia*, v. 24, p. 201–208, 2017.

RAN, C.; HU, J.; LIU, W.; LIU, Z.; HE, S.; DAN, B.C.T.; DIEM, N.N.; OOI, E.L.; ZHOU, Z. Thymol and carvacrol affect hybrid tilapia through the combination of direct stimulation and an intestinal microbiota-mediated effect: Insights from a germ-free Zebrafish model. *Journal of Nutrition*, v. 146, p. 1132–1140, 2016.

RODRIGUES, A.P.O. Nutrition and feeding of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Boletim do Instituto de Pesca, v. 40, p. 135-145, 2018.

ROQUES, S.; DEBORDE, C.; RICHARD, N.; SKYBA-CASSY, S.; MOING, A.; FAUCONNEAU, B. Metabolomics and fish nutrition: a review in the context of sustainable feed development. Reviews in Aquaculture, v. 12, p. 261–282, 2020.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P. Nonspecific defence mechanisms assay in fish: ii. potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs. In: SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; WALUGA, J. (Eds.). Disease diagnosis and prevention methods, FAO-Project GCP/INT/526/JPN, IFI, Olsztyn, pp. 105–111, 1993.

SOARES, B.V.; NEVES, L.R.; FERREIRA, D.O.; OLIVEIRA, M.S.B.; CHAVES, F.C.M.; CHAGAS, E.C.; GONÇALVES, R.A.; TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). Veterinary Parasitology, v. 234, p. 49–56, 2017.

SOARES, B.V.; NEVES, L.R.; OLIVEIRA, M.S.B.; CHAVES, F.C.M.; DIAS, M.K.R.; CHAGAS, E.C.; TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. Aquaculture, v. 452, p. 107–114, 2016.

SOUZA, A.R.L.; COPATTI, C.E.; MORANTE, V.H.P.; DA COSTA, M.M.; BRAGA, L.G.T.; SOUZA, A.M.; MELO, F.V.S.T.; CAMARGO, A.C.S.; MELO, J.F.B. Crude extract from yellow yam (*Dioscorea cayennensis*) in *in-vitro* *Lactobacillus* spp. assessment, and as a growth promoter in tambaqui juveniles (*Colossoma macropomum*). *Journal of Applied Aquaculture*, 2022.

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

SUBASINGHE, R.; SOTO, D.; JIA J. Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, v. 1, p. 2–9, 2009.

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

SUTILI, F.J.; GATLIN III, D.M.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, p. 716–726, 2018.

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. Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W.S. (Eds.), *Aquicultura no Brasil: Novas perspectivas*. São Carlos, Brazil: Pedro & João, pp. 11–30, 2015.

VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, p. 1–19, 2016.

VENTURA, A.S.; SILVA, T.S.C.; ZANON, R.B.; INOUE, L.A.K.A.; CARDOSO, C.A.L. Physiological and pharmacokinetic responses in neotropical *Piaractus mesopotamicus* to the essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) as an anesthetic. *International Aquatic Research*, v. 11, p. 1–12, 2019.

VERAS, H.; RODRIGUES, F.; BOTELHO, M.; MENEZES, I.; COUTINHO, H.; COSTA, L. Antimicrobial Effect of *Lippia sidoides* and thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the bacterium isolated from Root Canals. *Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1–5, 2014.

VOLPATTI, D.; CHIARA, B.; FRANCESCA, T.; MARCO, G. Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella anguillarum* of *D. labrax* fed carvacrol supplemented diets. *Aquaculture Research*, v. 45, p. 31–44, 2014.

WALTER, H.E. Proteinases: Methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. (Ed), Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 270–277, 1984.

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

YILMAZ, E.; ERGÜN, S.; YILMAZ, S. Influence of Carvacrol on the Growth Performance, Hematological, Non-Specific Immune and Serum Biochemistry Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food and Nutrition Sciences*, v. 6, p. 523–531, 2015.

YILMAZ, S.; ERGÜN, S.; ÇELİK, E.Ş. Effect of dietary spice supplementations on welfare status of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences, v. 86, p. 229–237, 2014.

ZHANG, R.; WANG, X.W.; LIU, L.L.; CAO, Y.C.; ZHU, H. Dietary oregano essential oil improved the immune response, activity of digestive enzymes, and intestinal microbiota of the koi carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, v. 518, p. 734–781, 2020.

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.

ZEPPENFELD, C.C.; SACCOL, E.M.H.; PÊS, T.S.; SALBEGO, J.; KOAKOSKI, G.; DOS SANTOS, A.C.; HEINZMANN, B.M.; DA CUNHA, M.A.; BARCELLOS, L.J.G.; PAVANATO, M.A.; CARON, B.O.; BALDISSEROTTO, B. *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen* – Stress and antioxidant parameters. *Aquaculture Nutrition*, v. 23, p. 1362–1367, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

Ambos os óleos essenciais mostraram fraca atividade inibitória contra *A. hydrophila* ($\geq 3.125,00 \mu\text{g mL}^{-1}$). No teste para determinar a habilidade de produção de biofilme, dois isolados de *A. hydrophila* apresentaram capacidade de produzir biofilme. A interferência dos OELS e OECC na formação de biofilme foi classificada como não produtor e fraco produtor de biofilme para cada isolado de *A. hydrophila*. Foi verificado efeito bactericida no biofilme previamente consolidado na atividade do OELS em ambos os isolados e para OECC para apenas um dos isolados. Com tudo, OELS apresentou melhores resultados, pois apresentou efeito sinérgico com florfenicol, enquanto EOCF apresentou efeito aditivo.

A suplementação de $0,50 \text{ mL OELS kg dieta}^{-1}$ promoveu melhoria nas variáveis de desempenho e aumentou os valores de hematócrito, taxa de hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média, glicose plasmática, glicogênio hepático e muscular dos juvenis. Dietas suplementadas com $1,00$ e $1,50 \text{ mL de OELS kg dieta}^{-1}$ aumentaram os níveis de triglicérides, albumina, lisozima e alanina aminotransferase (ALT) plasmática, atividade das enzimas intestinais amilase e lipase em tambaqui. O aumento dos níveis de OELS na dieta dos peixes reduziu a atividade da protease alcalina intestinal. Conclui-se que OELS e OECC (*in vitro*) foram capazes de interferir na formação do biofilme e não apresentaram efeito antagônico em combinação com florfenicol. Em adição, a inclusão de $0,50$ a $1,00 \text{ mL OELS kg dieta}^{-1}$ demonstrou melhorar ganho de crescimento, metabolismo, parâmetros hematológicos e atividade de lisozima plasmática e das enzimas intestinais amilase e lipase em

juvenis de tambaqui.

Os resultados gerados nesta tese são fundamentais para uma melhor compreensão da ação dos OELS e OECC atividade antibacteriana, antibiofilme e, o efeito sinérgico com florfenicol contra *A. hydrophila* e do OELS na suplementação dietética em relação ao desempenho de crescimento e a saúde de juvenis de tambaqui. Contudo, ainda são necessários novos estudos para entender melhor a ação dos compostos bioativos presentes nos OELS e OECC tanto em estudos *in vivo*, quanto *in vitro* na aquicultura.