



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FERNANDA SMANIOTTO

Avaliação da inclusão de óleos essenciais e probióticos na alimentação de tilápia-  
do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) para o controle de *Aeromonas hydrophila*

**CAMPINAS**

**2022**

FERNANDA SMANIOTTO

Avaliação da inclusão de óleos essenciais e probióticos na alimentação de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) para o controle de *Aeromonas hydrophila*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Animal na área de concentração Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA  
PELA ALUNA FERNANDA SMANIOTTO E  
ORIENTADA PELA DRA. MARCIA MAYUMI  
ISHIKAWA

Orientadora: Marcia Mayumi Ishikawa

Co-orientadora: Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

Sm22a Smaniotto, Fernanda, 1996-  
Avaliação da inclusão de óleos essenciais e probióticos na alimentação de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) para o controle de *Aeromonas hydrophila* / Fernanda Smaniotto. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Marcia Mayumi Ishikawa.  
Coorientador: Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Peixe - Criação. 2. Antibióticos. 3. Patógenos. 4. Suplementos dietéticos. 5. Agentes anti-infecciosos. I. Ishikawa, Marcia Mayumi. II. Queiroz, Sonia Claudia do Nascimento de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of the inclusion of essential oils and probiotics in Nile tilapia feed for the control of *Aeromonas hydrophila*

**Palavras-chave em inglês:**

Fish culture  
Antibiotics  
Pathogens  
Dietary supplements  
Anti-infective agents

**Área de concentração:** Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

**Titulação:** Mestra em Biologia Animal

**Banca examinadora:**

Marcia Mayumi Ishikawa [Orientador]  
Julio Ferraz de Queiroz  
Luiza Ishikawa Ferreira

**Data de defesa:** 19-04-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Animal

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3648-6885>  
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7972348785491178>

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Campinas,

Dra. Marcia Mayumi Ishikawa

Dr. Julio Ferraz de Queiroz

Dra. Luiza Ishikawa Ferreira

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata da Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno

Aprendi a olhar as estrelas enquanto percorro os desafios da trilha;  
Aprendi a guardar no peito os tesouros amigos que encontro durante o  
caminho;  
Aprendi que minha força sempre aparecerá nos momentos de maior  
fraqueza;  
E que nada nem ninguém pode destruir nossos sonhos.

•LUNA

## **AGRADECIMENTOS**

**Chamo de amigos e família aqueles que estiveram verdadeiramente comigo durante todos os momentos. Só eles acompanharam os momentos felizes, tristes, ansiosos, as brincadeiras, as reflexões e principalmente as batalhas diárias. A eles sou eternamente agradecida.**

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.**

**Agradeço a CAPES, CNPq e ao projeto BRSAqua pelo apoio financeiro.**

**Aos colegas da Embrapa Meio Ambiente (Julio Ferraz de Queiroz, Rodrigo Fernandes Castanha, José Henrique Vallim, Mara Denise Luck Mendes) que abriram as portas para mim e me acompanharam durante essa experiência de vida.**

**A orientação exercida pela pesquisadora Marcia Mayumi Ishikawa, que sempre ofereceu sua ajuda e sua disposição em todos os momentos deste mestrado.**

**A co-orientação exercida pela pesquisadora Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz, por ter me acompanhado durante essa fase.**

**A pesquisadora Ana Lucia Penteado por ter me auxiliado nas atividades do laboratório de microbiologia ambiental da Embrapa Meio Ambiente.**

**Agradeço aos colegas de laboratório (Juliana Gil, Giovanni Ferri, Júlia Nascimento, Rafaela, Fernanda Pertrine e Caico Pires), na qual pude ter a honra de chamar de amigos, para eles deixo meu mais sincero obrigada por terem feito meus dias mais coloridos.**

**Agradeço a minha mãe, Cristina Ferrante, que sempre esteve comigo me apoiando, me dando força para continuar em momentos difíceis, você é meu mundo.**

**Nunca esquecerei aqueles que realmente estiveram ao meu lado.**

## RESUMO

Os problemas referentes à sanidade dos animais nas pisciculturas vão muito além de perdas de rendimentos para os produtores, envolve a busca de inovações nos meios de produção, com o objetivo de evitar esses prejuízos e com isso conseguir acompanhar a demanda crescente por alimentos, fornecendo aos consumidores produtos com maior qualidade e segurança. Entre os problemas enfrentados pelos produtores é o aparecimento de doenças nos peixes decorrentes de infecções bacterianas que podem causar a morte dos peixes. O controle convencional dessas doenças é através do uso de antibióticos, que se usados de forma incorreta, apresentam riscos para a saúde dos peixes e para a saúde dos consumidores. Dentre as inovações, se encontram o uso de aditivos alimentares com a função de trazer inúmeros benefícios para a saúde e desenvolvimento dos peixes. O objetivo desta dissertação é demonstrar que o uso de óleos essenciais e probióticos como aditivos alimentares em Tilápias-do-Nilo trazem benefícios para a saúde dos peixes frente a patógenos. Para isso, o projeto foi dividido em duas partes: *in vitro* e *in vivo*. A fase *in vitro* consistiu na elaboração de ensaios antagônicos com três óleos essenciais (canela casca, hortelã pimenta e coentro erva), quatro linhagens bacterianas isoladas (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bacillus clausii*) e um pool probiótico (Flora 5®) contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*, além da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e testes de toxicidade com *Artemia salina* para os óleos essenciais. Ao final dos testes *in vitro* tanto o óleo de canela quanto o probiótico Flora 5® foram escolhidos para compor os testes *in vivo* por apresentarem maior atividade inibitória. O segundo capítulo se refere à implementação desses aditivos na alimentação das Tilápias-do-Nilo em três tratamentos (controle, tratamento com Flora 5® e tratamento com óleo de canela). Os peixes do controle foram alimentados com rações sem aditivos, no tratamento com probiótico, a alimentação dos animais foi suplementada com Flora 5® na proporção 9 g por kilo de ração e no tratamento com óleo essencial, adicionou-se 1,5 gramas de óleo de canela por kilo de ração. Após a suplementação por 35 dias, realizou-se três coletas: momento 0, 24 e 48 horas após a exposição dos peixes à *A. hydrophila*. com a finalidade de avaliar a influência dos aditivos nos parâmetros hematológicos, nos parâmetros físico-químicos da água, no crescimento e no estado de saúde dos peixes. Nos resultados, houve variações significativas na turbidez da água, na concentração de hemoglobina e PPT do perfil hematológico, na contagem de leucócitos e trombócitos, além de verificar diferenças no aparecimento de sinais clínicos da doença entre os tratamentos. Diante desses resultados, conclui-se que tanto o óleo de canela quanto o probiótico Flora 5 trouxeram benefícios à saúde

das Tilápias-do-Nilo, fato esse que pode ser usado em benefício tanto dos piscicultores, trazendo maior estabilidade na produção, menores gastos em tratamentos de doenças e maiores lucros pela venda de peixes com melhores desempenhos zootécnicos, o que beneficia também os consumidores que terão produtos alimentícios com maior qualidade na sua nutrição.

**Palavras-chave:** piscicultura, antibióticos, patógeno, suplementos alimentares, antimicrobiano.

## ABSTRACT

Problems related to the health of animals in fish farms go far beyond loss of income for producers, it involves the search for new technologies and innovations in the means of production, with the aim of avoiding these losses and thus being able to keep up with the growing demand for food, providing consumers with products with higher quality and safety. Among the problems faced by producers is the appearance of diseases in fish resulting from bacterial infections that can cause the death of fish. Conventional control of these diseases is through the use of antibiotics, which, if used incorrectly, pose risks to the health of fish and the health of consumers. Among the innovations are the use of food additives with the function of bringing numerous benefits to the health and development of fish and thus reducing the use of antibiotics and their harm. The objective of this dissertation is to demonstrate that the use of essential oils and probiotics as food additives in Nile Tilapias bring benefits, in addition to ensuring the health of these animals against pathogens. For this, the project was divided into two parts: in vitro and in vivo. The in vitro phase consisted in the development of antagonistic assays with three essential oils (cinnamon bark, peppermint and coriander herb), four isolated bacterial strains (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bacillus clausii*) and a probiotic pool. (Flora 5®) against *Aeromonas hydrophila* bacteria, in addition to determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and toxicity tests with *Artemia salina* for essential oils. At the end of the in vitro tests, both cinnamon oil and the probiotic Flora 5® were chosen to compose the in vivo tests because they present greater inhibitory activity. The second chapter refers to the implementation of these additives in Nile Tilapia feed in three treatments (control, Flora 5® treatment and cinnamon oil treatment). The control fish were fed diets without additives, in the treatment with probiotic, the animals' food was supplemented with Flora 5® in the proportion of 9 g per kilo of ration and in the treatment with essential oil, 1.5 grams of oil was added. of cinnamon per kilo of feed. After supplementation for 35 days, three collections were performed: time 0, 24 and 48 hours after fish exposure to *A. hydrophila* in order to evaluate the influence of additives on hematological parameters, physicochemical parameters of water, growth and health status of fish. In the results, there are significant variations in the turbidity of the water, in the concentration of hemoglobin and PPT of the hematological profile, in the count of leukocytes and thrombocytes, in addition to verifying differences in the appearance of clinical signs of the disease between treatments. In view of these results, it is concluded that both cinnamon oil and the probiotic Flora 5 brought benefits to the health of Nile Tilapias, a fact that can be used to the benefit of

both fish farmers, bringing greater stability in production, lower costs in disease treatments and greater profits from the sale of fish with better zootechnical performance, which also benefits consumers who will have food products with higher quality nutrition.

**Keywords:** fish farming, antibiotics, pathogen, food supplements, antimicrobial.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 01** - Comparação da produção mundial da pesca extrativista e aquicultura

**Figura 02** - Representação, em percentagem, dos ramos da aquicultura no Brasil.

**Figura 03** - Principais espécies produzidas no Brasil

**Figura 04** - Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), uma das 77 espécies de tilápias já descritas

**Figura 05** - Sinais clínicos de Tilápias-do-Nilo infectadas por *Aeromonas hydrophila*. (A) Manchas ou petéquias na pele, (B) Nadadeiras com erosão (desfiadas/necrosadas) e com congestão, (C) olhos com catarata e hemorragias.

**Figura 06** - Impactos da pesca extrativista excessiva

**Figura 07** - Principais fatores que contribuem para a extinção de espécies de peixes

**Figura 08** - Crescimento dos setores de carne no Brasil

**Figura 09** - Produção pesqueira do Brasil por captura e aquicultura (em mil toneladas)

**Figura 10** - Produção da aquicultura nacional em 2018

**Figura 11** - Distribuição da Aquicultura no Brasil

**Figura 12** - Aumento da produção anual de peixes (2014-2021).

**Figura 13** - Principais espécies produzidas no Brasil entre os anos de 2013 e 2018.

**Figura 14** - Evolução da produção de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no mundo

**Figura 15** - Maiores produtores de Tilápia do Brasil em 2021

**Figura 16** - Fisionomia da espécie Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

**Figura 17** - Sinais Clínicos em *Oreochromis niloticus*: (A) Hemorragias no corpo do peixe, (B) Ulcerações com descamações cutâneas no corpo do peixe, (C) Abdômen inchado (hepatomegalia).

**Figura 18** - Mecanismos de ação dos óleos essenciais em células bacterianas

**Figura 19** - Hortelã-pimenta (*Mentha piperita*)

**Figura 20** - Casca da canela (*Cinnamomun zeylanicum*)

**Figura 21** - Coentro (*Coriandrum sativum*)

**Figura 22** - Microcrustáceo adulto da espécie *Artemia salina*

**Figura 23** - Mecanismos de ação probiótica

**Figura 24** - Esquematização das sequências de poços (1-12) e das repetições (A-B-C) utilizadas no teste CIM em uma placa de 96 poços.

**Figura 25** - Halos de inibição formados pelos óleos essenciais no crescimento da bactéria *Aeromonas hydrophila*. **A:** Controle positivo. **B:** Óleo essencial de Hortelã-pimenta. **C:** Óleo essencial de Coentro erva. **D:** Óleo essencial de Canela casca

**Figura 26** - CIM obtido pela observação da reação do composto TTC ao crescimento bacteriano.

**Figura 27** - Visualização dos halos de inibição dos probióticos com as identificações já nomeadas na metodologia, onde cada número é uma linhagem em determinado tratamento.

**Figura 28** - Distribuição dos peixes nos aquários. **A:** Sistema de aquários antes da distribuição dos peixes. **B:** Sistema de aquários com os peixes já inseridos e distribuídos.

**Figura 29** - Preparo do probiótico Flora 5®. **A:** Ativação do probiótico na forma de pó em leite 10%. **B:** Crescimento do probiótico ativo em leite na estufa à 35°C por 48 horas

**Figura 30** - Diluição do óleo de canela em álcool de cereais

**Figura 31** - Preparo semanal da ração. **A:** Utilização de pulverizador manual para o preparo das rações dos tratamentos com probiótico e óleo de canela. **B:** Pulverização manual da ração

**Figura 32** - Separação da ração em porções diárias. **A:** Pesagem da quantidade diária da ração em uma balança analítica. **B:** Rações já separadas em tubos Falcon na proporção de duas unidades por aquário em um dia.

**Figura 33** - Infecção experimental dos peixes por *Aeromonas hydrophila*. **A:** Determinação da concentração do patógeno ( $10^7$  UFC) a ser inoculado no peixe através do aparelho Densimat. **B:** Inoculação do patógeno por meio de injeção intraperitoneal.

**Figura 34** - Contagem de eritrócitos em Câmara de Neubauer na objetiva de 40X em um microscópio óptico comum

**Figura 35** - Esquema do Sistema de recirculação da água utilizado neste experimento

**Figura 36** - Sistema de recirculação da água

**Figura 37** - Gráficos de dispersão representando os parâmetros físico-químicos da água: temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg/L), condutibilidade (μS/cm), amônia e turbidez (NTU) nos três tratamentos (Controle, Óleo Canela e Probiótico) durante os 30 dias mensurados.

**Figura 38** - Realização da biometria nas Tilápias-do-Nilo. **A:** medição do peso. **B:** medição do comprimento

**Figura 39** - Diferenciação visual do comprimento padrão e comprimento total

**Figura 40** - Gráficos do tipo Boxplots demonstrando as variações do peso (g) e comprimento (cm) entre tratamentos durante 35 dias

**Figura 41** - Sinais clínicos de septicemia causados pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. **A:** Manchas e petéquias no abdômen. **B:** Cauda corroída. **C:** Olho saltado (exoftalmia). **D:** Hemorragia generalizada..

**Figura 42** - Número de eritrócitos obtido pela contagem em Câmara de Neubauer

**Figura 43** - Gráficos do tipo Boxplots representando as variáveis hematológicas nos três diferentes momentos (coletas) da infecção por *Aeromonas hydrophila*

**Figura 44** - Gráficos do tipo Boxplots expressando os valores de VCM E CHCM nos três diferentes momentos (coletas) da infecção por *Aeromonas hydrophila*

**Figura 45** - Células sanguíneas de Tilápia-do-Nilo na objetiva de 100X em um microscópio optico comum durante a contagem de leucócitos e trombócitos.

**Figura 46** - Representação do Leucograma e Trombograma em forma de gráficos do tipo Boxplots nos três diferentes momentos (coletas) da infecção por *Aeromonas hydrophila*

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01** - Características gerais dos diferentes sistemas de criação na piscicultura

**Tabela 02** - Respostas dos peixes frente a diferentes intervalos de temperatura

**Tabela 03** - Principais bacterioses que infectam os peixes

**Tabela 04** - Principais plantas utilizadas na extração de óleos essenciais

**Tabela 05** - Classificação da sensibilidade dos óleos essenciais através do tamanho dos seus halos

**Tabela 06** - Concentrações correspondentes as 12 diluições nos poços da placa para cada óleo essencial.

**Tabela 07** - Organização dos três tratamentos

**Tabela 08** - Média dos halos de inibição (mm) produzidos pelo potencial antagônico dos óleos essenciais frente à *Aeromonas hydrophila*.

**Tabela 09** - Classificação da sensibilidade dos óleos frente a bactéria *Aeromonas hydrophila*

**Tabela 10** - Média dos halos de inibição resultantes do antagonismo dos probióticos frente a *Aeromonas hydrophila*.

**Tabela 11** - Parâmetros Físico-Químicos da água durante 30 dias

**Tabela 12** - Limites estabelecidos para a qualidade da água pelo CONAMA, Resolução No. 357/2005

**Tabela 13** - Peso (g) medido nas quatro biometrias

**Tabela 14** - Comprimento Total e Comprimento Padrão medido nas quatro biometrias

**Tabela 15** - Valores da biomassa (g) por cada biometria realizada

**Tabela 16** - Crescimento (cm) e ganho de peso totais

**Tabela 17** - Taxa de Conversão Alimentar (TCA) determinada para cada tratamento em gramas

**Tabela 18** - Perfil hematológico dos peixes já expostos aos três tratamentos empregados nas três coletas realizadas.

**Tabela 19** - Índices Hematimétricos calculados para os diferentes tratamentos em três momentos (coletas) da infecção por *Aeromonas hydrophila*

**Tabela 20** - Leucograma e Trombograma resultantes da contagem total de células

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BALs** - Bactérias ácido-láticas  
**CIM** - Concentração Inibitória Mínima  
**CL<sub>50</sub>** - Concentração Letal Média  
**TTC** - Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio  
**TSA** - Caldo Triptona de Soja Agar  
**TSB** - Caldo Triptona de Soja  
**OE<sub>s</sub>** - Óleos essenciais  
**UFC** – Unidades Formadoras de Colônia  
**CHCM** - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média  
**COND.** - Condutividade  
**TURB.** - Turbidez  
**PM** – Peso Médio  
**BM** - Biomassa  
**GP** – Ganho de Peso  
**CT** – Crescimento Total  
**TCA** – Taxa de Conversão Alimentar  
**VCM** – Volume Corpuscular Médio  
**ERIT.** - Eritrócito  
**PH** – Potencial Hidrogeniônico  
**HTC** - Hematócrito  
**HB** – Hemoglobina  
**PPT** - Proteína Plasmática Total  
**GLIC.** - Glicose  
**TEMP.** - Temperatura  
**O.D.** - Oxigênio Dissolvido  
**CT** – Comprimento Total  
**CP** – Comprimento Padrão

## SUMÁRIO

|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                | <b>19</b> |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                      | <b>25</b> |
| 2.1. Aquicultura.....                                     | 25        |
| 2.2. Aquicultura no Brasil.....                           | 27        |
| 2.3. Piscicultura.....                                    | 30        |
| 2.3.1. Piscicultura no Brasil.....                        | 30        |
| 2.3.2. Sistemas de Produção.....                          | 32        |
| 2.4. Tilapicultura.....                                   | 33        |
| 2.4.1. Produção de Tilápias no Brasil.....                | 33        |
| 2.4.2. Características das Tilápias.....                  | 35        |
| 2.5. Doenças em peixes.....                               | 38        |
| 2.6. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....                    | 40        |
| 2.7. Tratamentos convencionais .....                      | 42        |
| 2.8 Óleos essenciais.....                                 | 43        |
| 2.8.1. Hortelã Pimenta ( <i>Mentha piperita</i> ).....    | 46        |
| 2.8.2. Canela Casca ( <i>Cinnamomun zeylanicum</i> )..... | 47        |
| 2.8.3. Coentro ( <i>Coriandrum sativum</i> ).....         | 48        |
| 2.8.4. Toxicidade dos Óleos Essenciais.....               | 49        |
| 2.9. Probióticos.....                                     | 51        |
| 2.9.1. Efeitos na imunidade.....                          | 53        |
| 2.9.2. Efeitos no estresse.....                           | 54        |
| 2.9.3. Efeitos no trato gastrointestinal.....             | 55        |
| 2.9.4. Bactérias Ácido Lácticas (BALs).....               | 55        |
| 2.9.5. Produção de Ácido Láctico.....                     | 56        |
| 2.9.6. Produção de Bacteriocinas.....                     | 56        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                  | <b>57</b> |
| 3.1. Objetivo Geral.....                                  | 57        |
| 3.2. Objetivos Específicos.....                           | 57        |
| <b>CAPÍTULO 1: ENSAIOS <i>IN VITRO</i>.....</b>           | <b>58</b> |

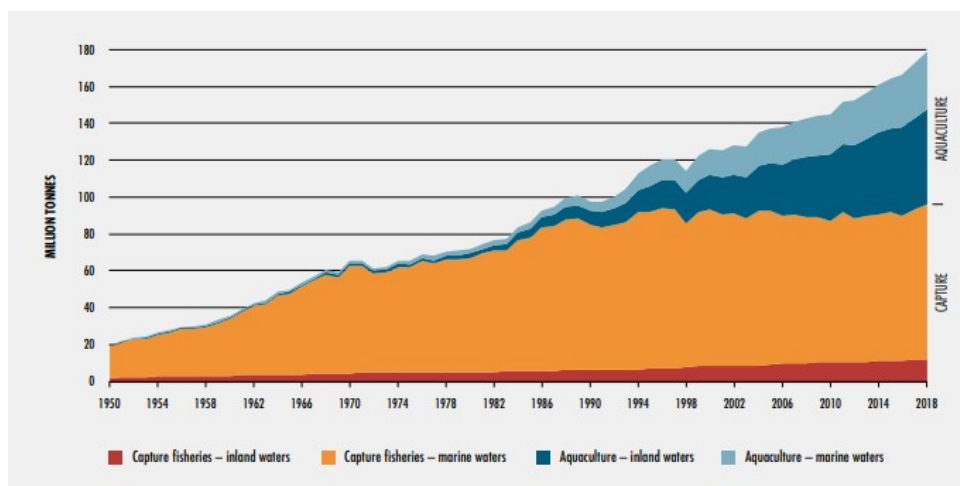
|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>                                        | <b>59</b> |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                           | <b>59</b> |
| 2.1. Ensaio com Óleos Essenciais.....                                       | 59        |
| 2.1.1. Aquisição do Óleos Essenciais.....                                   | 59        |
| 2.1.2. Aquisição da Bactéria Patogênica.....                                | 59        |
| 2.1.3. Ensaio Antagônico por Difusão em Disco.....                          | 60        |
| 2.1.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) com<br>TCC..... | 60        |
| 2.1.5. Teste de Toxicidade com <i>Artemia salina</i> .....                  | 62        |
| 2.2. Ensaio com Probióticos.....                                            | 62        |
| 2.2.1. Aquisição dos Probióticos.....                                       | 62        |
| 2.2.2. Ativação das Bactérias Ácido-láticas.....                            | 63        |
| 2.2.3. Ativação da Bactéria Patogênica.....                                 | 63        |
| 2.2.4. Ensaio Antagônico por Difusão em Ágar.....                           | 63        |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                       | <b>64</b> |
| 3.1. Ensaio com Óleos Essenciais.....                                       | 64        |
| 3.1.1. Ensaio Antagônico por Difusão em Disco.....                          | 64        |
| 3.1.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) com TCC.....                    | 67        |
| 3.1.3. Teste de Toxicidade com <i>Artemia salina</i> .....                  | 69        |
| 3.2. Ensaio Antagônicos com Probióticos.....                                | 70        |
| <b>4. Considerações Finais do Capítulo 1.....</b>                           | <b>77</b> |
| <b>CAPÍTULO 2: ENSAIOS <i>IN VIVO</i>.....</b>                              | <b>79</b> |
| <b>1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>                                        | <b>80</b> |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                           | <b>80</b> |
| 2.1. Aquisição dos Animais e Aclimação.....                                 | 80        |
| 2.2. Protocolo Experimental.....                                            | 81        |
| 2.2.1. Incorporação na Ração.....                                           | 81        |
| 2.2.2. Infecção pelo Patógeno.....                                          | 84        |
| 2.2.3. Biometria.....                                                       | 84        |
| 2.2.4. Avaliação Clínica do Peixes.....                                     | 85        |
| 2.2.5. Parâmetros Hematológicos.....                                        | 85        |

|                                                            |            |
|------------------------------------------------------------|------------|
| <b>2.2.6. Monitoramento Físico-Químico da Água.....</b>    | <b>86</b>  |
| <b>2.2.7. Modelo Estatístico.....</b>                      | <b>86</b>  |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                      | <b>87</b>  |
| <b>3.1. Monitoramento Físico-Químico da Água.....</b>      | <b>87</b>  |
| <b>3.2. Crescimento e desenvolvimento dos peixes.....</b>  | <b>92</b>  |
| <b>3.3. Sobrevivência e sinais clínicos de doença.....</b> | <b>98</b>  |
| <b>3.4. Parâmetros hematológicos e bioquímicos.....</b>    | <b>102</b> |
| <b>3.5. Contagem leucócitos e trombócitos.....</b>         | <b>111</b> |
| <b>4 Considerações Finais do Capítulo 2.....</b>           | <b>115</b> |
| <b>CONCLUSÃO.....</b>                                      | <b>116</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                     | <b>118</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                                         | <b>146</b> |
| <b>APÊNDICES.....</b>                                      | <b>148</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional resultou na busca por maior disponibilidade de alimentos que pudessem atender as necessidades da população. Devido a isso, diversos setores alimentares tiveram que se aprimorar e aumentar sua demanda alimentar. Dentre os setores que tiveram aumento com esse crescimento populacional foi o setor do pescado, que tem como objetivo capturar e fornecer para o mercado um número cada vez maior de peixes (ANDRADE; YASUI, 2003). A atividade da pesca extrativista, não se remete apenas a captura de peixes, mas também de outros organismos aquáticos e está se tornando fonte de muitos impactos ambientais, causando poluição de rios e mares e sua sobrepesca pode levar a extinção de algumas espécies (FAO, 2012).

Uma atividade que está crescendo como alternativa para diminuir os impactos ambientais da pesca extrativista é a aquicultura, que é definida por SILVA (2003) como criação de diversos organismos aquáticos. De acordo com FAO (2018), o pescado alcançou em 2016, 171 milhões de toneladas, onde 47% representam a aquicultura. Na **Figura 1** da SOFIA (2020) pode-se observar o aumento do setor da aquicultura nos últimos em comparação com a pesca extrativista, estimando que em 2018 a produção global de peixes foi de 179 milhões de toneladas.

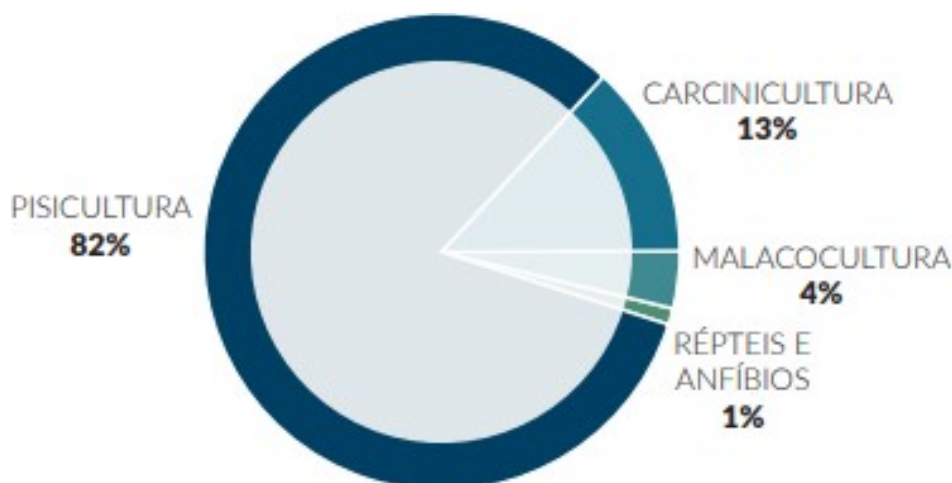


Fonte: FAO, 2020

**Figura 01:** Comparação da produção mundial da pesca extrativista e aquicultura

A aquicultura pode ser subdividida em vários ramos de produção: malacocultura (criação de moluscos), carcinicultura (criação de camarões), ranicultura (criação de anfíbios, principalmente rãs) e a principal subdivisão, a piscicultura (criação de peixes) (**Figura 2**)

(TAVARES-DIAS; MARIANO, 2015). Pode-se dizer que o Brasil apresenta condições favoráveis para esta prática, como um clima favorável, áreas para o plantio de grãos para produção de rações e um cobiçável potencial hídrico, que somando com a carência de alimentos só faz sua importância aumentar (BAPTISTA et al., 2018).



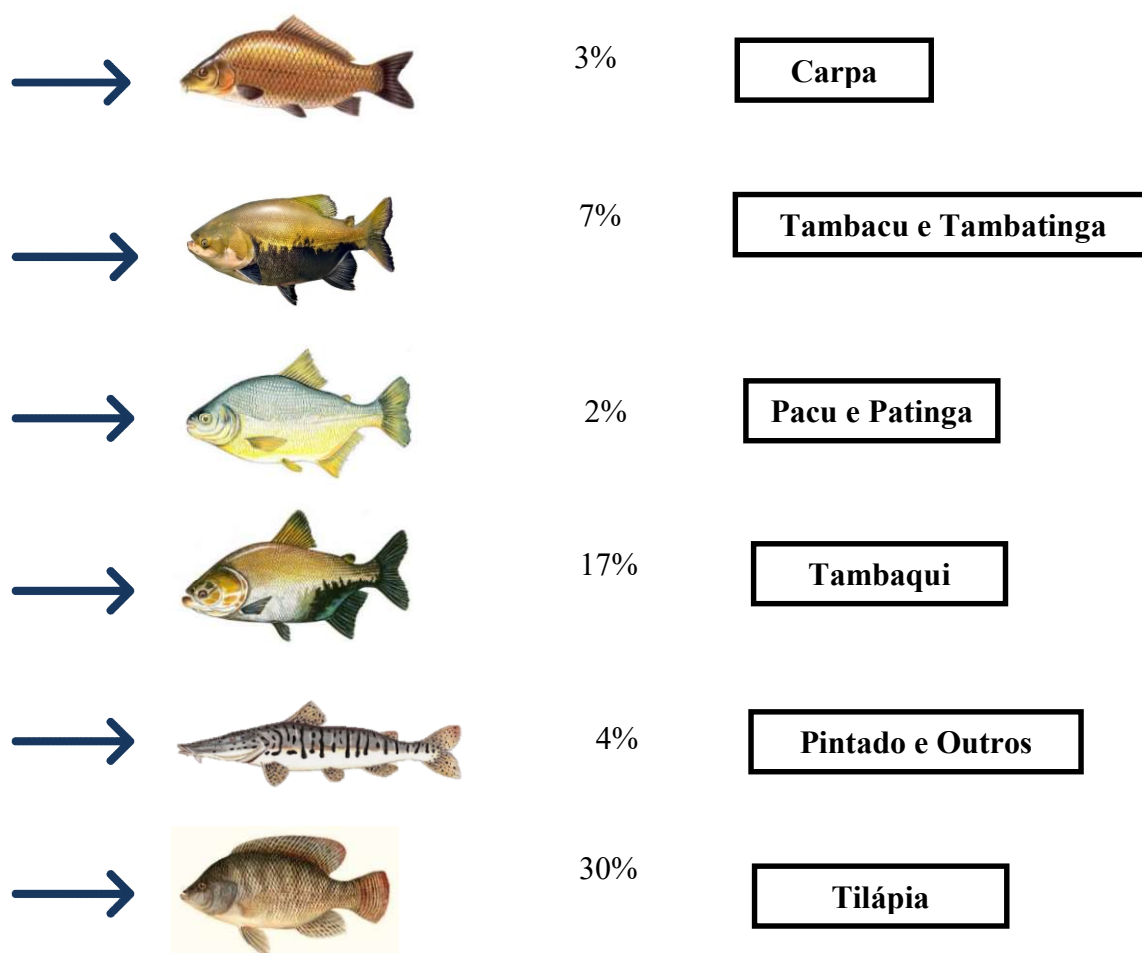
Fonte: SEBRAE, 2015.

**Figura 02:** Representação, em porcentagem, dos ramos da aquicultura no Brasil.

Dentre todos os ramos da aquicultura, a prática da piscicultura disponibiliza não só uma maior certeza quanto à qualidade e quantidade de seus produtos, oferecendo uma fonte alimentar saudável (OLIVEIRA, 2009), como também proporciona várias oportunidades de emprego e um sustento para os produtores (LESTON *et al.*, 2011).

Diversas espécies de peixes são produzidas no Brasil, dentre as mais conhecidas estão a Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), Tambaqui (*Colossoma macropomum*), carpa (*Cyprinus carpio*), pacu (*Piaratus mesopotamicus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), truta (*Oncorhynchus mykiss*), pirarucu (*Arapaima gigas*), entre outras (SEBRAE, 2015). Na **Figura 03** estão representadas a porcentagem de representação das principais espécies de peixes produzidas no Brasil.

Das espécies listadas, a tilápia é um dos grupos que mais cresce nos cultivos, sendo a espécie mais cultivada no Brasil e a de maior importância econômica, representando 83% da piscicultura nacional e contribuindo mais de 47% para a produção nacional (**Figura 04**) (SEBRAE, 2015). No Brasil, a grande demanda pela tilápia se estende tanto para o mercado nacional, quanto para o mercado internacional. Os motivos que levam essa espécie a ser mais explorada são: fácil reprodução, carne de ótima qualidade, ótimo valor de mercado, baixos custos de produção e fácil adaptabilidade aos sistemas de cultivo (OLIVEIRA, 2009).



Fonte: IBGE, 2019b.

**Figura 03:** Principais espécies produzidas no Brasil

Apesar da Tilápia-do-Nilo ser uma espécie considerada mais resistente, o não seguimento das boas práticas de manejo contribuem para a ocorrência de parasitas, bactérias, fungos e vírus que comprometem o desenvolvimento do animal e como consequência final leva à morte dos peixes (MÁRQUEZ *et al.*, 2014). Os principais agentes patogênicos são: *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas spp*, *Vibrio anguillarum*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus spp*, *Enterococcus spp* e *Francisella spp* (MARTINS *et al.*, 2008; LEIRA *et al.*, 2016).



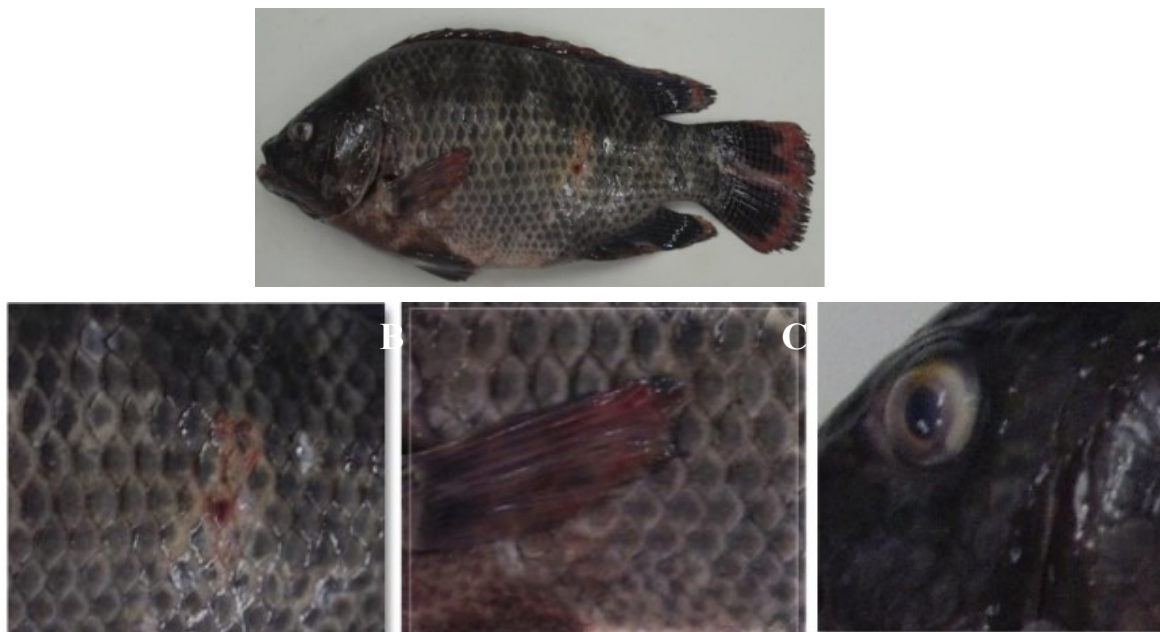
**Figura 04:** Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), uma das 77 espécies de tilápias já descritas

Um dos agentes patogênicos responsável por causar diversos prejuízos para piscicultura tropical devido a rapidez no aparecimento de sinais clínicos são as bactérias do gênero *Aeromonas* spp, são Gram negativas, não encapsuladas, apresentam respiração aeróbica ou anaeróbica e se encontram na forma de bastonetes móveis (KOZINSKA, 2007). Esse gênero se faz presente na microbiota natural dos peixes sem causar grandes problemas, mas quando os animais são expostos a fatores estressantes pode ocorrer um desequilíbrio da microbiota e assim manifestações da doença, causando surtos infecciosos com elevada mortalidade (CIPRIANO, 2001).

Os principais sintomas encontrados em peixes infectados com *Aeromonas* sp são: lesões hemorrágicas internas, hemorragias nas brânquias, nas aberturas naturais, nos órgãos internos, acúmulo de fluídos opacos ou sanguinolentos e úlceras externas (AUSTIN; AUSTIN, 1987). Essa doença não só prejudica a saúde dos peixes como também apresenta riscos para saúde dos piscicultores e consumidores (**Figura 05**) (VIEIRA, 2004).

Contudo, a manutenção regular dos cuidados necessários impede a proliferação de doenças e a disseminação de patógenos por todo o cultivo (MARTINS, 2004). Buscando sempre desenvolver boas práticas de manejo, além de procurar novas tecnologias e inovações nos métodos de criação, para garantir o equilíbrio e a estabilidade que o ambiente necessita, ao preservar a terra, a água, a flora e a fauna e impedir que quaisquer alterações destes venham a prejudicar o cultivo (MICHELS; ROCHMANN, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2009). Um dos cuidados mais primordiais que influencia diretamente no desenvolvimento e na saúde dos peixes e indiretamente no comportamento, reprodução é o fornecimento de alimentos de alta qualidade e com todos os nutrientes essenciais para a nutrição animal (CYRINO *et al.*, 2010). Os principais nutrientes essenciais, que devem compor a dieta diária dos peixes são compostos

por proteínas, carboidratos, lipídios e minerais como o fósforo (TAVARES-DIAS, 2009).



Fonte: ALMEIDA *et al.*, 2013.

**Figura 05:** Sinais clínicos de Tilápias-do-Nilo infectadas por *Aeromonas hydrophila*. **(A)**Manchas ou petéquias na pele, **(B)** Nadadeiras com erosão (desfiadas/necrosadas) e com congestão, **(C)** olhos com catarata e hemorragias.

Os cuidados com a água também são de suma importância, servindo tanto como fonte de oxigênio como meio de dispersão e assimilação de resíduos. Alguns dos parâmetros que devem ser verificados diariamente ou semanalmente para garantir a qualidade da água são: temperatura, oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade, transparência, sólidos totais suspensos, turbidez, condutividade, concentração de fósforo, nitrogênio, nitrito e amônia (ROTTA; QUEIROZ, 2003). A manutenção dos parâmetros sempre está relacionada com o manejo aplicado, as espécies cultivadas, a composição do alimento fornecido e a quantidade de matéria orgânica depositada (MERCANTE *et al.*, 2004).

Esses dois cuidados mencionados anteriormente estão intrinsecamente interligados, já que fatores como a temperatura da água, tamanho do animal e a qualidade da água podem alterar a absorção dos nutrientes (FRASCÁ-SCORVO *et al.*, 2001; BORDA *et al.*, 2003).

Mesmo com todos esses cuidados nem sempre se consegue evitar o aparecimento de doenças e quando isso acontece, são utilizados usualmente, como tratamento, os antibióticos, que apresentam o efeito de impedir ou inibir o crescimento bacteriano, atacando os

componentes das células bacterianas (LIU *et al.*, 2012). Porém, muitos compostos presentes nos antibióticos não são completamente metabolizados pelos animais, os quais são eliminados através da urina e fezes. Esses compostos ao entrar em contato com água e sedimentos podem abranger efeitos negativos e tóxicos para organismos não alvos, como plantas e outros animais aquáticos que não fazem parte do ciclo produtivo (KEMPER, 2008; RICO; BRINK, 2014). Seu uso contínuo ou seu uso exacerbado pode resultar na seleção de patógenos resistentes, transmitindo genes de resistência entre eles, além de desequilibrar a microbiota natural dos peixes (SEBASTIÃO, 2015).

Com o objetivo de diminuir o uso dos tratamentos convencionais, agressivos e tóxicos para os animais e meio ambiente, novos aditivos funcionais estão sendo adicionados nas dietas dos peixes (RINGO *et al.*, 2010). Os dois aditivos mais conhecidos no campo da pesquisa são os fitoterápicos e os probióticos. A formulação dos fitoterápicos consiste na utilização de diversas partes das plantas, como folhas, flores, sementes, tubérculos e raízes, para se obter óleos essenciais e extratos que nada mais são que misturas complexas de compostos químicos (ALBERT; RANSANGAN, 2013). Os óleos essenciais possuem diversos compostos ativos, entre eles estão os fenóis, polifenóis, alcaloides, quinonas e lectinas, que são responsáveis por exercer efeitos bactericidas, fungicidas e parasiticidas contra as mais importantes bactérias patogênicas, dentre elas a bactéria *Aeromonas hydrophila* (SILVA; FERNANDES JUNIOR, 2010; HARIKRISHNAN *et al.*, 2010).

Já os probióticos consistem em cepas microbianas vivas que suplementam a alimentação dos peixes, beneficiando a saúde do hospedeiro (VERRCHUERE *et al.*, 2000). Ação dos probióticos na fisiologia dos peixes pode ser resumida nos seguintes mecanismos: inibição do crescimento de células bacterianas patogênicas através de competições por sítios de adesão na mucosa intestinal, competições por nutrientes e produções de compostos inibidores com ação bactericida, além da produção de enzimas e vitaminas que estimula um maior crescimento do animal e uma maior absorção de nutrientes (SAHU *et al.*, 2008; TAPIA-PANIAGUA *et al.*, 2010). Dentre bactérias mais utilizadas como probióticos encontram-se os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* (WANG *et al.*, 2008).

Tanto os óleos essenciais como os probióticos exercem diversos benefícios comuns na fisiologia dos peixes. Suas atuações se dão principalmente no trato gastrointestinal, conseguindo modificar as estruturas intestinais, equilibrar a microbiota intestinal, afim de melhorar a absorção de nutrientes provenientes dos alimentos. Podem agir como imunostimulantes ao aumentar a eficiência da resposta imune inata e adaptativa e assim influenciando positivamente na tolerância ao estresse frente a diversos fatores estressantes.

Apresentam também atividades antagônicas contra patógenos, reduzindo a capacidade destes de colonizarem o trato digestório e assim, diminuindo o número de casos de doenças nos peixes (STEINER; ENCARNÇÃO, 2010; CRUZ, 2012; AZEVEDO *et al.*, 2015). E o fator principal que os diferencia dos tratamentos convencionais é a falta de demasiados riscos ambientais, já evidenciados no uso dos antibióticos, proporcionando maior sustentabilidade para a produção e maior rendimento destinada ao consumo (CHITMANAT *et al.*, 2005; MARINO *et al.*, 2010)

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Aquicultura

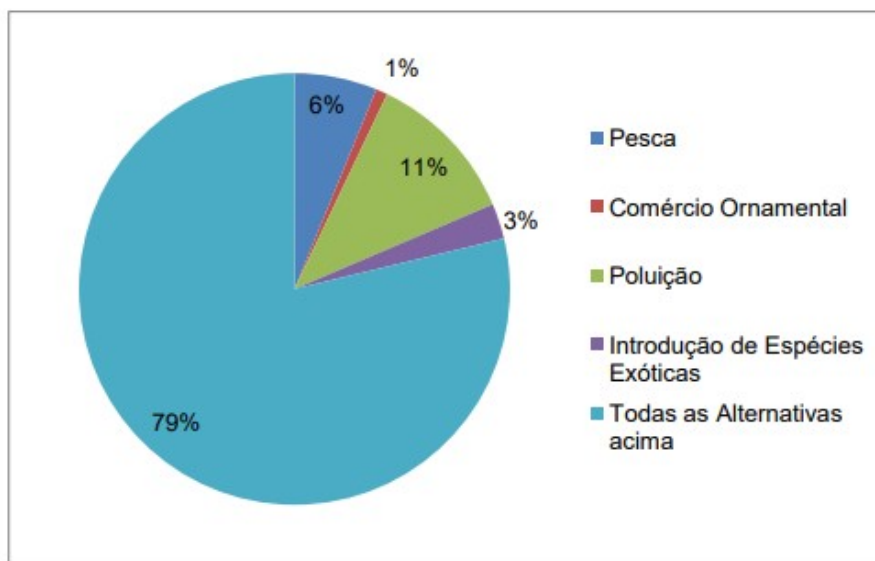
A pesca extrativista é uma das atividades humanas mais antigas, sendo definida pela extração de organismos aquáticos do próprio habitat natural e destinada ao consumo humano. Entretanto, atualmente, essa prática não supri mais a demanda da população, que se encontra cada vez mais numerosa. (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017). Além disso, diversos impactos da pesca extrativista já observados, citados na **Figura 06**. Esses impactos envolvem tanto as esferas ambientais quanto econômicas e estão relacionados com a contaminação ambiental e a pesca excessiva, causando diversos prejuízos para o meio ambiente (SCOPEL; COSTA, 2011).



Fonte: SCOPEL; COSTA (2011)

**Figura 06:** Impactos da pesca extrativista excessiva

Além da sobrepesca extrativista ser um dos principais causadores de extinções de espécies de interesse comercial e espécies nativas, como pode ser observado na **Figura 07** (ROSA& LIMA, 2008).



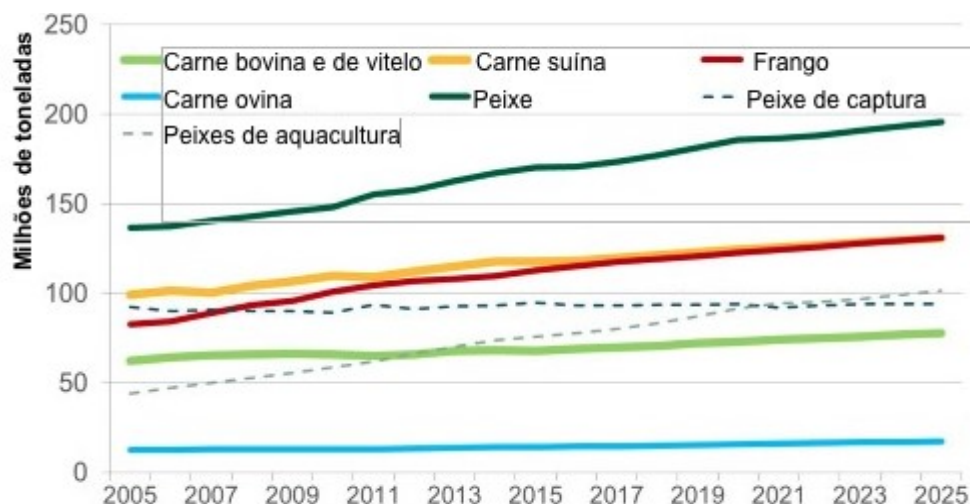
Fonte: ROSA&LIMA, 2008

**Figura 07:** Principais fatores que contribuem para a extinção de espécies de peixes

A implementação de uma nova área de criação animal denominada de aquicultura, que representa todos os cultivos de organismos aquáticos, como plantas aquáticas, moluscos, crustáceos, répteis, anfíbios e peixes, em um espaço confinado e controlado, promoveu uma maior demanda de pescados, acarretando a diminuição dos prejuízos que a pesca extrativista causava, em maiores lucros para os produtores e produtos de maior qualidade para os consumidores (BOYD; QUEIROZ, 2001). A aquicultura por ser uma área produtiva multidisciplinar, são produzidas espécies de diversos táxons, tendo destaque no cultivo de ostras, mariscos, mexilhões, camarões, carpas, tilápias e salmões (OLIVEIRA, 2009).

Apesar da manutenção de peixes em cativeiros para interesses humanos não ser uma ação recente, o desenvolvimento da aquicultura por empresas comerciais só iniciou no último século, quando começaram a dominar sua reprodução em cativeiro (FAO, 2009). De acordo com FAO (2020), a aquicultura é o setor produtivo de alimentos que se desenvolveu mais rapidamente nos últimos 50 anos, crescendo a uma média de 5,3% ao ano desde a virada do século. Essa atividade também ganhou destaque na América Latina, onde países como Brasil, Chile, Equador e México contribuem com mais de 80% da produção (BASTOS *et al.*, 2004). Além disso, desde 2005, é o setor que mais cresceu em comparação a outros setores de carne (bovina, ovina, suína e frango) e a estimativa para o ano de 2025 é que cresça e se torne o

setor de proteína animal mais produtivo (**FIGURA 08**)

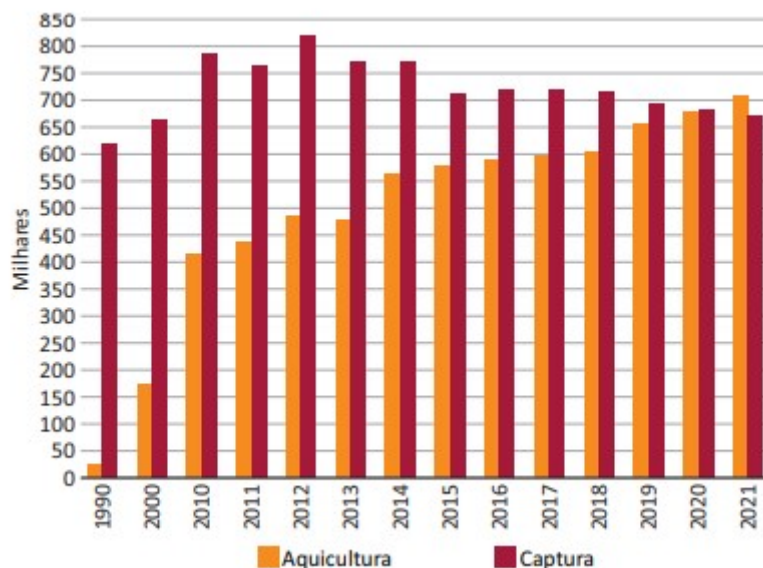


Fonte: FAO, 2016

**Figura 08:** Crescimento dos setores de carne no Brasil

## 2.2. Aquicultura no Brasil

A aquicultura foi o setor que mais cresceu entre os anos de 2004 e 2014, com média anual de crescimento de aproximadamente 8%, contra 5,1% para bovinos, 4,1% para o frango e 2,9% para suínos. Já comparando esse crescimento no ano 2018, a aquicultura nacional cresceu cerca de 5,8 % ao comparar com o ano de 2017, produzindo cerca de 579 mil toneladas em 2018 (IBGE, 2018). Seguindo esse caminho, FAO (2020) elaborou uma projeção da produção de aquicultura do ano de 1990 até o ano de 2021, na qual pode-se observar uma produção superior a 706 mil toneladas da aquicultura, passando a representar 51% da produção pesqueira total do País (**Figura 09**).

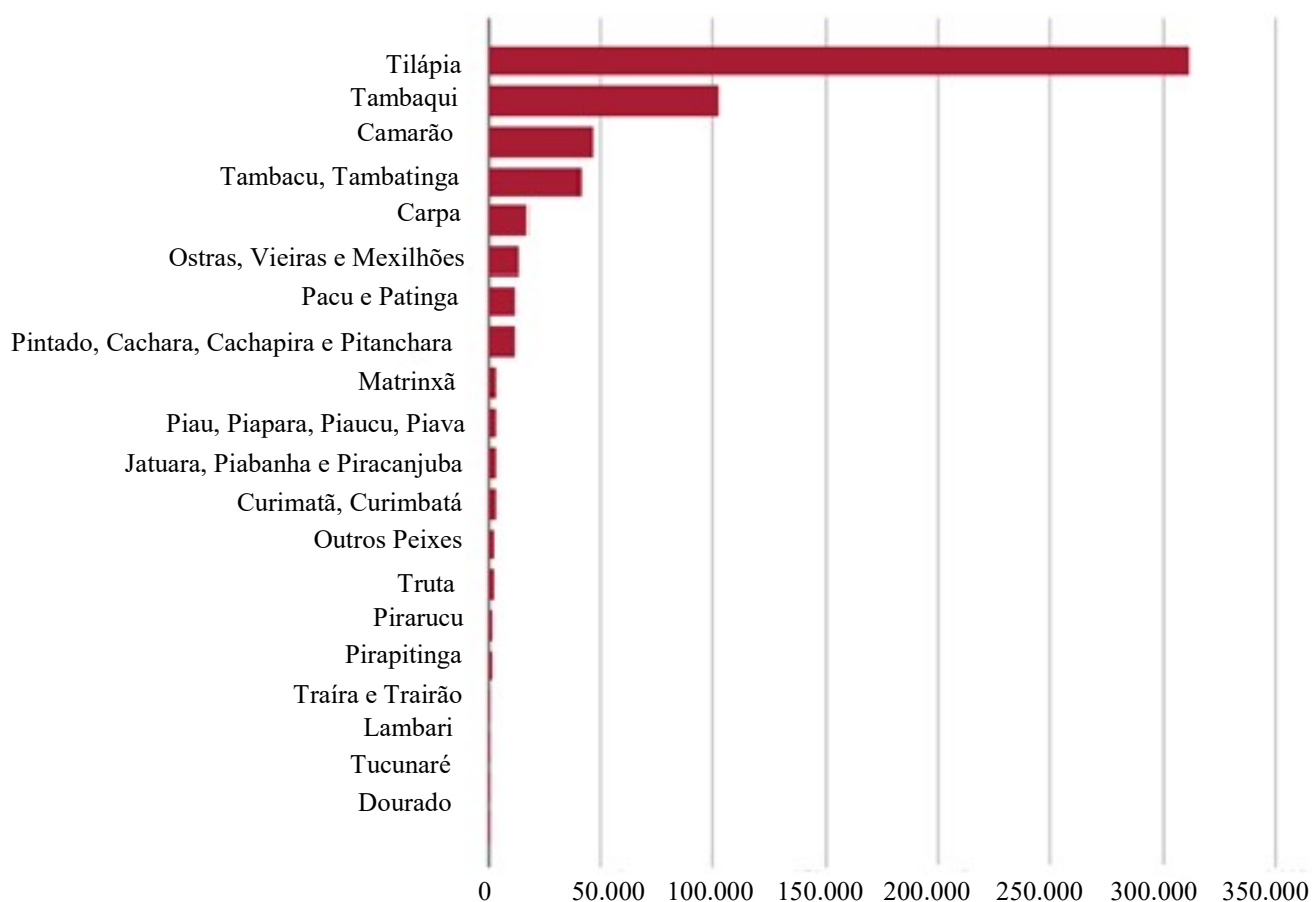


Fonte: FAO, 2020.

**Figura 09:** Produção pesqueira do Brasil por captura e aquicultura (em mil toneladas)

Em relação aos próximos anos, uma estimativa feita pela ONU BRASIL (2016) relata que até o ano de 2025 a aquicultura brasileira tenha um crescimento de aproximadamente 103% devido a diversos investimentos que estão sendo realizados.

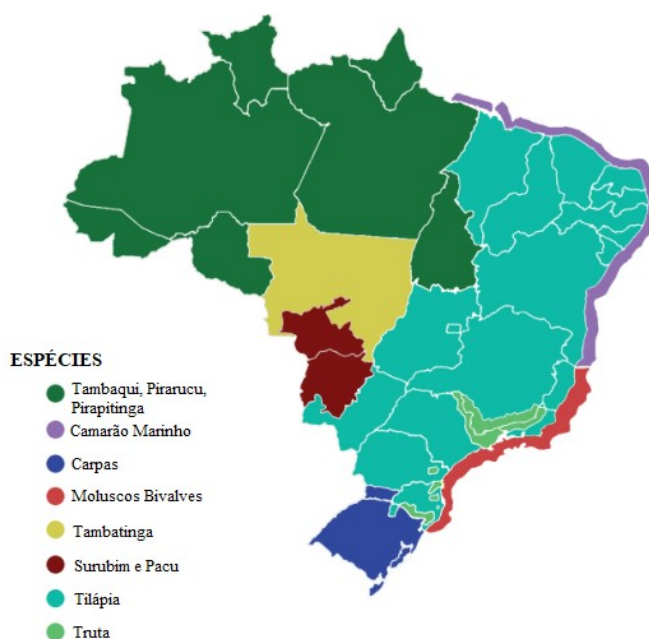
Esse crescimento é explicado pela vantagem territorial aquática que o Brasil possui, com um extenso litoral, conferindo a esse país um enorme potencial para o desenvolvimento da atividade aquícola, além de uma fonte alimentar mais previsível, constante e disponível no ano todo (BAPTISTA et al., 2018). E essas consequências positivas que o território aquático do Brasil trouxe para a aquicultura nacional podem ser observadas pela grande diversidade de espécies produzidas, totalizando mais de 35 espécies (**Figura 10**) (IBGE/PPM, 2018). Entre todas as espécies cultivadas, pode-se destacar organismos aquáticos como tilápia (*Oreochromis* spp.), camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e seus híbridos (IBGE, 2016).



Fonte: IBGE/PPM (2018)

**Figura 10:** Produção da aquicultura nacional em 2018

A aquicultura está difundida por todo o país, assumindo variações na distribuição dos seus ramos nos diferentes estados brasileiros (**Figura 11**). Porém, é na costa sul-sudeste brasileira que essa atividade se assume de grande importância como fonte alternativa de alimento, de renda e de trabalho (KUBITZA; ONO, 2010).



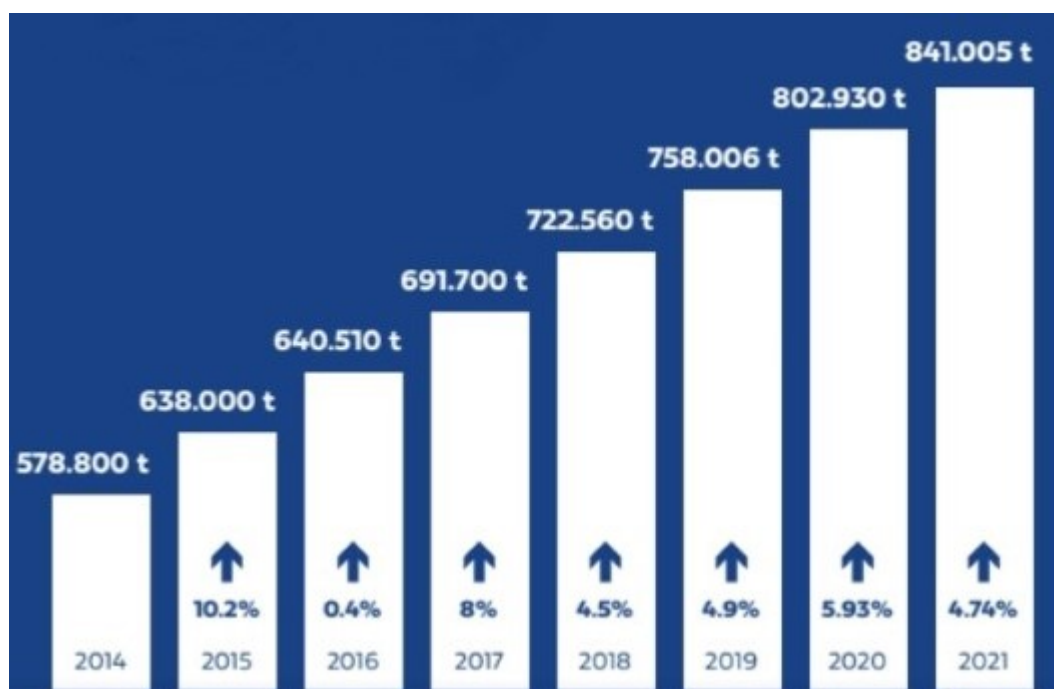
Fonte: MPA, 2015

**Figura 11:** Distribuição da Aquicultura no Brasil

## 2.3. Piscicultura

### 2.3.1. Piscicultura no Brasil

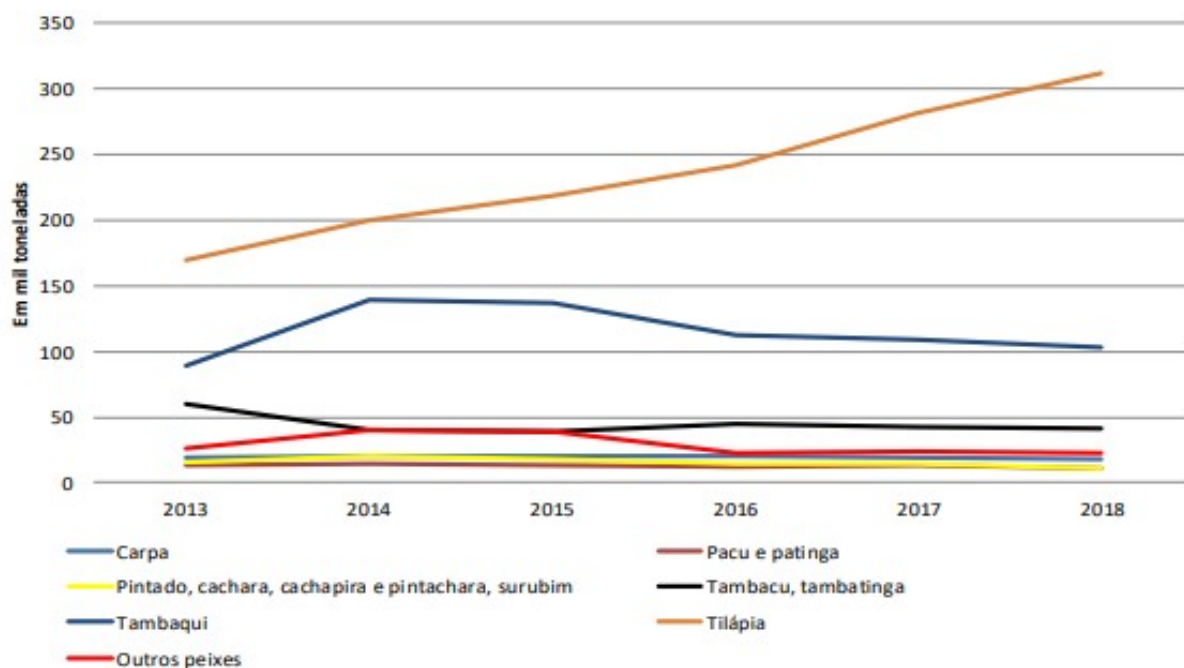
Dentro da Aquicultura, o ramo que mais se destaca é a piscicultura, caracterizada pela criação e produção de peixes em cativeiros (MPA, 2013). Essa produção só foi aumentando conforme os anos, no ano de 2019 foram produzidas cerca de 758.006 toneladas, um aumento significativo de 4,9% em comparação aos outros anos (**Figura 12**) (PEIXEBR, 2020). Já nos anos de 2020 e 2021, houve um acréscimo de 5,93% e 4,74% respectivamente, chegando a produzir só no ano de 2021 cerca de 841.005 toneladas de peixes.



Fonte: PEIXEBR, 2022

**Figura 12:** Aumento da produção anual de peixes (2014-2021).

Dentre as espécies de peixes mais produzidas no Brasil temos: tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), tambacu (híbrido de tambaqui com pacu), carpa (*Cyprinus carpio*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pirarucu (*Arapaima gigas*), tendo como principal espécie produzida a tilápia-do-nilo (FILHO, 2017). Na **Figura 13** pode-se observar as principais espécies de peixes produzidas, em mil toneladas, entre os anos de 2013 e 2018.



Fonte: IBGE, Pesquisa Pecuária Municipal, 2019.

**Figura 13:** Principais espécies produzidas no Brasil entre os anos de 2013 e 2018.

A distribuição dessas espécies no Brasil por região é: tambaqui, pirarucu e pirapitinga na região Norte; tilápia no Nordeste; tambaqui, pacu e pintado no Centro-Oeste; tilápia, pacu e pintado no Sudeste; e carpa, tilápia, jundiá na região Sul (EMBRAPA, 2017), porém ao todo são produzidas mais de 30 espécies (SCORVO FILHO, 2002).

### 2.3.2. Sistemas de produção

Dentro da piscicultura, existem diversos sistemas de criação que se diferenciam pela frequência do controle da qualidade da água, pela espécie do peixe, pela composição da alimentação e pela quantidade de peixes requeridos, classificando os sistemas de produção em sistema extensivo, semi-intensivo, intensivo e super-intensivo. Os cuidados e o tempo de manutenção requeridos variam em ordem crescente, necessitando de mais investimentos, maior espaço e mais mãos de obra no sistema intensivo do que no sistema extensivo (**Tabela 01**) (PEZZATO; BARROS, 2005). E devido a esses diversos sistemas de produção, aliados a inovações e cuidados redobrados no ramo pesqueiro, o fornecimento e consumo de peixes conseguiu superar o crescimento populacional (1,6 % a mais) desde 1961 (FAO, 2018).

**Tabela 01:** Características gerais dos diferentes sistemas de criação na piscicultura

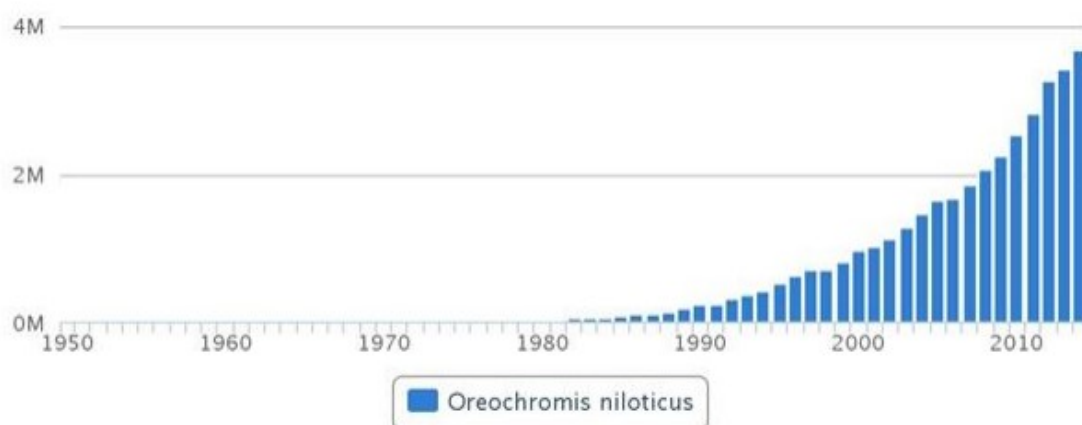
| TIPOS DE SISTEMA       | CARACTERÍSTICAS                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>EXTENSIVO</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pequenos produtores</li> <li>• Em pequenas áreas de espelho de água</li> <li>• Não utiliza rações</li> <li>• Pouco controle na qualidade da água</li> <li>• Nível de estocagem pequena</li> <li>• Menores taxas de produtividade</li> </ul>      |
| <b>SEMI-INTENSIVO</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pequeno investimento</li> <li>• Em tanques escavados</li> <li>• Qualidade da água parcialmente monitorada</li> <li>• Uso de rações poucas vezes</li> <li>• Monocultivos</li> <li>• Maior produtividade</li> </ul>                                |
| <b>INTENSIVO</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pequenos tanques com alta densidade de estocagem</li> <li>• Uso de tanque-rede em lagos e açudes</li> <li>• Uso de rações diariamente</li> <li>• Monitoramento da qualidade da água periodicamente</li> <li>• Alta produtividade</li> </ul>      |
| <b>SUPER-INTENSIVO</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Grandes tanques de concretos ou sistemas maiores de tanque-rede</li> <li>• Constantes renovações de água</li> <li>• Uso de rações artificiais de alta qualidade</li> <li>• Aplicação de alta tecnologia</li> <li>• Alta produtividade</li> </ul> |

Fonte: RIBEIRO *et al.*, 2010

## 2.4. Tilapicultura

### 2.4.1. Produção de tilápias no Brasil

A tilápia foi introduzida pela primeira vez em território nacional em 1970 e assim, sendo considerada então uma espécie exótica, expandindo sua distribuição rapidamente pelo mundo todo e alcançando mais de 135 países produtores (FAO, 2016). No Brasil, a produção de tilápia começou a ter um notório crescimento a partir nos anos 80, como pode observar na **Figura 14**. Mas foi só em 1990 que, com o avanço em sua produção, colocou o Brasil no ranking de maiores produtores de tilápia (PICKLER *et al.*, 2017).



Fonte: FAO FishStat , 2018

**Figura 14:** Evolução da produção de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no mundo

Dentre os estados nacionais, o ranking de produção de Tilápias teve liderança oscilante. Em 2004, o estado do Ceará alcançou a liderança desse ranking com 18 mil toneladas e Paraná ficou em segunda posição com 6 mil toneladas. Mas a situação mudou em 2013 para 2015, o Paraná começou a liderar com a produção de 63 mil toneladas em 2015 (BAPTISTA et al., 2018).

Em se tratando de dados mais atuais, a tilapicultura em 2021 alcançou o patamar de 534.005 toneladas de tilápia no Brasil, ou seja, com um aumento de 9,8% em relação ao ano anterior, representando 63,5% da produção nacional de pescado, mantendo o Paraná na liderança, com o cultivo de 182.000 toneladas, seguido pelo estado de São Paulo com 76.140 toneladas (**Figura 15**) (PeixeBR, 2022).



Fonte: PEIXE BR, 2022

**Figura 15:** Maiores produtores de Tilápia do Brasil em 2021

#### 2.4.2. Características das Tilápias

As Tilápias pertencem ao grupo de peixes ciclídeos, estão divididas em três principais grupos taxonômicos, com cerca de 100 espécies distribuídas nesses três gêneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*, e com no mínimo 77 espécies só no gênero *Oreochromis* (POPMA; PHELPS, 1998). Esses três gêneros se distinguem pelo comportamento reprodutivo, na qual os indivíduos do gênero *Tilapia* spp incubam seus ovos em substratos, já os do gênero *Oreochromis* spp incubam os ovos na boca da fêmea e *Sarotherodon* spp incubam os ovos na boca do macho ou de ambos (Panorama da Aquicultura, 1995).

Abaixo está contido a classificação taxonômica da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-Nilo) segundo POPMA; LOVSHIN (1996).

Reino: Animalia

Sub-Reino: Metazoa

Filo: Chordata

Sub-filo: Vertebrata

Superclasse: Osteichthyes

Classe: Actinopterygii

Super-ordem: Acanthopterygii

Ordem: Peciformes

Família: Cichlidae

Subfamília: Pseudocrenilabrinae

Gênero: *Oreochromis*.

Espécie: *Oreochromis niloticus*

As espécies que mais se destacam na produção nacional são Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Tilápia rendali (*Coptodon rendalli*), Tilápia de Zanzibar (*Sarotherodon hornorum*) e Tilápia tailandesa (nova variedade da Tilápia do Nilo) (LOVSHIN, 1998). Já a espécie com mais interesse econômico é a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertence a Ordem Peciforme, Família Cichlidae e Subfamília Pseudocrenilabrinae. Originou-se na bacia do rio Nilo, o que explica a escolha de seu nome e se distribui em regiões tropicais e subtropicais. São peixes considerados resistentes a diversas alterações ambientais, entre elas as alterações de temperatura, tendo a faixa ideal para seu desenvolvimento de 25°C a 30°C e as consequências da alteração da temperatura para a espécie estão expressas na **Tabela 02** (SILVA *et al.*, 2015).

**Tabela 02:** Respostas dos peixes frente a diferentes intervalos de temperatura

| TEMPERATURA | RESPOSTAS FISIOLÓGICAS                                                    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------|
| >38°C       | Morte                                                                     |
| 30 a 38°C   | Falta de apetite, maior incidência de doenças, resistência ao manejo      |
| 25 a 30°C   | Conforto térmico                                                          |
| 20 a 25°C   | Queda no consumo de alimento e no crescimento                             |
| 14 a 20°C   | Queda no crescimento, maior incidência de doenças e resistência ao manejo |
| < 14°C      | Morte                                                                     |

Fonte: (SILVA *et al.*, 2015)

A fisionomia da Tilápia-do-nilo pode ser descrita como presença de listras verticais, corpo achatado lateralmente e com coloração acinzentada, variando seu peso entre 4 à 10 kg (**Figura 16**). A facilidade em controlar a alimentação dessa espécie pode estar relacionada ao seu hábito onívoro, abrangendo, no ambiente natural, diversas espécies de organismos aquáticos na sua dieta, como fitoplâncton, plantas aquáticas, invertebrados, entre outros (SCORVO FILHO, 2002).



Fonte: (SILVA *et al.*, 2015)

**Figura 16:** Fisionomia da espécie Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Apresentam alto potencial de desenvolvimento em diversos sistemas de produção por conter diversas qualidades que elevam sua importância, como uma alimentação variada de alimentos, resistência a maioria das doenças, resistências as condições estressantes, podendo sobreviver a valores de pH e temperatura fora do intervalo ideal de crescimento (GALLI, 1984; FERREIRA; GONTIJO, 1984a,1984b).

Seu potencial também é deferido por conseguir se adaptar a diferentes ambientes, como ambientes de salinidade intermediária, com uma reprodução mais simples com crescimento constante e super-povoamentos facilmente alcançados, totalizando 45% da produção de peixes em 2015 (IBGE, 2016; EMBRAPA, 2017). Além de serem produtos desejáveis para o mercado consumidor pela carne ser de excelente qualidade, branca, com gosto e textura que agrada os consumidores (ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2004). Essas vantagens explicam por que, hoje, a tilápia é a segunda espécie de peixe mais cultivada no mundo e a primeira mais cultivada no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

## 2.5. Doenças em Peixes

Com a expansão da piscicultura e o desenvolvimento de novos e maiores sistemas de produção devem vir junto medidas de cuidado para garantir o sucesso na piscicultura como: implementação de boas práticas de manejo, controle periódico da qualidade da água, realização de quarentena na aquisição de novos lotes, aclimatização adequada dos novos peixes, fornecimento de alimentação de qualidade com todos os nutrientes balanceados. Desse jeito mantendo um ambiente estável e equilibrado, garantindo a saúde dos animais (MICHELS; PROCHMANN, 2003).

Porém, nem sempre os cuidados necessários são tomados e muitas das doenças nos peixes tem origem com a falta de boas práticas de manejo, dentre elas estão: utilização de linhagens de peixes inadequadas para determinado cultivo, densidade de animais estocados superior ao limite de capacidade, excesso de alimentação, falta de limpeza, alimentação inadequada ou com nutrientes não balanceados, saída da água pela superfície e não pelo fundo do viveiro, falta de monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água e falta de acompanhamento e observação das condições dos peixes (MARTINS *et al.*, 2002 b).

Todos esses fatores trazem consequência na saúde dos peixes, ou seja, qualquer alteração brusca no equilíbrio do meio aquático pode causar uma cascata de reações nos peixes, deixando-os em estado de estresse (DOMINGUES, 2014). O estresse imposto pelas condições ambientais reflete diretamente no sistema imunológico dos peixes e na homeostasia deles, retardando a resposta imune do animal e predispondo-os ao ataque de organismos patogênicos (PAVANELLI *et al.*, 2008). As alterações ambientais não são os únicos fatores que deixam os peixes mais vulneráveis, os estímulos desagradáveis também estão presentes no transporte e retiradas, mesmo que breves, de seu habitat já aclimatizado (KUBITZA *et al.*, 2012).

As bactérias estão entre os agentes mais comuns e que causam mais prejuízo nas pisciculturas por serem consideradas oportunistas, desencadeando doenças quando o sistema imunológico dos peixes está debilitado que, consequentemente, resultará em altos níveis de mortalidade (LEIRA *et al.*, 2016). As principais bacterioses que provocam maior impacto são causadas pelas linhagens: *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* spp, *Vibrio anguillarum*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus* spp e *Enterococcus* spp, frequentes na microbiota natural da água (MARTINS *et al.*, 2008). Suas principais características se encontram na tabela a seguir (**Tabela 03**) e logo abaixo dela estão descritas mais detalhadamente.

**Tabela 03:** Principais bacterioses que infectam os peixes

| Doença                                                                             | Bactérias                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Columnariose ou Podridão das Nadadeiras ou Boca de algodão ou Podridão de Bânquias | <i>Flavobacterium columnaris</i>                              |
| Septicemia Móvel                                                                   | <i>Aeromonas</i> spp                                          |
| Vibriose                                                                           | <i>Vibrio</i> spp                                             |
| Estreptococose                                                                     | <i>Streptococcus iniae</i><br><i>Streptococcus agalactiae</i> |
| Edwardsiellose                                                                     | <i>Edwardsiella tarda</i>                                     |

Fonte: SEBASTIÃO *et al.*, 2017

Essas doenças descritas podem ser transmitidas horizontalmente pelo contato direto com as feridas na pele ou pelo contato com as fezes de peixes contaminados (SEBASTIÃO *et al.*, 2011). Esse plano de transmissão representa não só um prejuízo financeiro para as pisciculturas, como também representa um perigo para o meio ambiente e para a saúde pública (BRACCINI *et al.*, 2008).

As bactérias da linhagem *Flavobacterium columnare* são classificadas como Gram-negativas, não flageladas, causam a doença chamada columnariose. Os peixes com essa doença apresentam pontos acinzentados ou pontos de erosão na cabeça, superfície do corpo e nas brânquias, acarretando problemas na natação e respiração do animal (PILARSKI *et al.*, 2008).

Estreptococose é a enfermidade que bactérias do gênero *Streptococcus* sp. causam, são bactérias Gram-positivas. A doença vai se manifestar através do escurecimento do corpo, natação errática, olhos saltados, hemorragias espalhadas pelo corpo, brânquias e perto na base das nadadeiras, como também haverá um acúmulo de líquido observado pelo inchaço no abdome (FIGUEIREDO *et al.*, 2006).

As bactérias Gram-negativas do gênero *Pseudomonas* apresentam a forma de bacilos retos ou parcialmente curvados, causam a doença pseudomonose nos peixes, caracterizada por ascite hemorrágica, septicemia, podridão na nadadeira, grânulos no baço e abscessos na bexiga natatória (NOGA, 2010).

A Edwardsiellose é causada por bactérias do gênero *Edwardsiella*, Gram negativas, as manifestações clínicas, como em outras doenças, dependem da espécie do patógeno e

principalmente das condições nutricionais dos peixes, provocando septicemia hemorrágica ou enterite, além de distensão abdominal (CONROY; CONROY, 2006).

A bactéria anaeróbica Gram-positiva *Enterococcus* sp. apresenta sinais clínicos similares a doença Estreptococose, que consiste em hemorragias musculares, inflamação nos olhos e necrose no baço e rins (PLUMB, 1999). Outro caso de similaridade recai sobre as bactérias do gênero *Vibrio*, com sinais clínicos semelhantes aos causados pela *Aeromonas*, bactérias Gram negativas (ROBERTS, 2012).

## 2.6. *Aeromonas hydrophila*

O gênero *Aeromonas* pertencente à família Aeromonadaceae, contém 36 espécies relatadas, dentre elas, as espécies mais encontradas são: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* e *A. veronii* (FIGUEIRAS *et al.*, 2017). A linhagem *A. hydrophila* se destaca por ser móvel e mais virulenta que as demais (HOLLIMAN, 1993). São cocobacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos e apresenta em uma de suas extremidades um único flagelo móvel (WANTANABE *et al.*, 2002). Essas bactérias não só são encontradas em diversos habitats terrestres e principalmente aquáticos como também integram a flora intestinal normal dos peixes, quando saudáveis, não causando nenhum mal, somente manifestará a doença quando os animais forem submetidos a condições estressantes, consideradas, assim, como patógenos oportunistas (CNA, 2002). São intolerantes a níveis elevados de salinidade, anaeróbicas facultativas, classificadas como mesófilas por possuírem crescimento elevado em temperaturas aproximadas de 30°C, o pH ideal pode variar de 7 a 9, não suportando ambientes ácidos (EPA, 2006). Os sinais clínicos da doença Aeromonose são: necrose, ulcerações no pedúnculo caudal, no corpo e nas nadadeiras com descamações cutâneas, hemorragias principalmente nas brânquias e opérculos, hepatomegalia, esplenomegalia, ascite e septicemia hemorrágica (BHARADWAJ *et al.*, 2013). Também ocorre alterações comportamentais como: perda de apetite, apatia e natação errática (**Figura 17**) (CARRASCHI *et al.*, 2011).



Fonte: ALGAMMAL *et al.*, 2020

**Figura 17:** Sinais Clínicos em *Oreochromis niloticus*: (A) Hemorragias no corpo do peixe, (B) Ulcerações com descamações cutâneas no corpo do peixe, (C) Abdômen inchado (hepatomegalia).

Diante desses sintomas, está claro que o principal órgão afetado é a pele, até mesmo, pelo fato de ser considerado a primeira linha de defesa, o que foi corroborado pela pesquisa de ALMEIDA *et al.*, 2013, que analisou a presença das bactérias em Tilápias-do-Nilo na piscicultura da região semiárida, no sub-médio do Rio São Francisco, município de Paulo Afonso. Esta pesquisa também revelou que o fígado é o segundo órgão mais afetado. A contaminação de peixes destinados para o consumo humano por *Aeromonas hydrophila* representa perigos para a saúde pública, causando feridas em seres humanos quando expostos à água contaminada ou problemas gastrointestinais, como diarreias e gastroenterite quando essa água é ingerida, ocorrendo também a contaminação através de alimentos (HIRANSUTHIKUL *et al.*, 2005). Portanto, o peixe torna-se um veiculador de doenças, devido, particularmente, a presença de toxinas bacterianas na musculatura do animal com efeitos hemolítico, citotóxico e enterotóxico, tornando a carne inviável para o consumo (ALMEIDA *et al.*, 2013)

A patogenicidade (capacidade do agente de causar enfermidades) das bactérias esta intrinsecamente relacionada com os fatores de virulência que facilitam a entrada e a permanência do patógeno no hospedeiro, tendo como fatores de virulência do gênero *Aeromonas* sp. enterotoxinas, classificadas em dois tipos: citotônica (Alt e Ast) e citotóxicas (Act, Aerolisina e HlyA), relacionadas com a manifestação de diarreia da doença, além de aerolisina, flagelos A e B, lipase, elastase, serina, protease e Dnases (PUTHUCHEARY; PUAH; CHUA, 2012).

Outros fatores de virulência importantes são as hemolisinas, proteínas citolíticas extracelulares, que causam lesões na membrana celular ao entrar na camada bi-lipídica, alterando a permeabilidade da membrana (HOWARD; BUCKLEY, 1985). A aerolissina pode causar desconfiguração das microvilosidades intestinais, sinalizando o processo de apoptose das células eucarióticas (RASMUSSEN-IVEY *et al.*, 2016)

Diversas pesquisas já estudaram a presença da *Aeromonas* spp em peixes de diversos sistemas de produção. Como é o caso do estudo de SILVA (2010), que confirmou a presença do patógeno em 100% das amostras de peixe e água colhidas em pisciculturas da Região da Baixada Ocidental Maranhense, predominando a espécie *Aeromonas hydrophila* (87,03%). KIM *et al.* (2019) analisou a ocorrência da bactéria não só na carne do peixe como também em amostras de água de duas tilapiculturas na região semiárida de Pernambuco, além de examinar a frequência de genes de virulência presentes. Diante de 70 peixes analisados pelos autores, 84,7% estavam contaminados com o patógeno, confirmado por análises microbiológica e molecular e os genes de virulência mais frequentes foram a enterotoxina citotóxica e aerolisina.

Para diminuir a propagação desses agentes patogênicos e evitar os perigos da infecção que engloba tanto os consumidores quanto os próprios piscicultores, pondo em risco sua saúde e acarretando prejuízos financeiros, algumas condutas de prevenção e controle devem ser seguidas à risca, como boas práticas de manejo, limpeza periódica dos tanques, retirada imediata de peixes mortos ou com indícios de contaminação, manutenção da densidade de animais em nível compatível com o local onde são armazenados e manipular os peixes somente o necessário para evitar estresse (CNA, 2002).

## **2.7. Tratamentos convencionais de doenças em peixes**

A principal estratégia utilizada pelos produtores de pescado contra infecções é a aplicação de antimicrobianos, agentes quimioterápicos com capacidade de matar ou inibir o crescimento de microrganismos, desenvolvendo função terapêutica ou profilática (KUMMERER, 2009). O tratamento profilático é empregado a fim de prevenir as contaminações antes de situações de estresse para os peixes, como manejo ou transporte dos mesmos (WHO, 2004). Ao inserir antimicrobianos em pisciculturas deve-se sempre levar em conta suas características físicas e químicas, a dosagem ideal, o tempo de aplicação adequado e as espécies cultivadas (PEIXOTO; GOIANO; COSTA, 2012).

Porém seu uso indiscriminado, associado com a intensificação dos sistemas de produção, é a principal causa do aumento da resistência bacteriana a múltiplas drogas, já

relatadas entre as espécies de *Aeromonas hydrophila* (CHAUDHURY *et al.*, 1996). Além desta espécie, outras cepas já tiveram a resistência documentada pela utilização desenfreada destes antimicrobianos como: *A. salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida*, *Pasteurella piscicida* e *Yersinia ruckeri*, preocupando a comunidade científica e as organizações de saúde (CANADA-CANADA *et al.*, 2009). A aquisição de resistência pelas cepas pode ser concedida de duas formas: aquisição de genes de resistência através de plasmídios, transposons ou bacteriófagos ou pela mutação de diferentes sítios do cromossomo bacteriano, selecionando, assim uma subpopulação de microrganismos resistentes pressionadas pelo uso indevido de antimicrobianos (RIVERA-TAPIA, 2003; BUTAYE *et al.*, 2003).

Atentando-se aos mecanismos de resistência da linhagem *Aeromonas hydrophila*, esta bactéria consegue inibir a ação de alguns antibióticos, pertencentes a classe  $\beta$ -lactâmicos, através da produção de  $\beta$ -lactamases. Alguns dos antibióticos dessa classe são: penicilina, amoxicilina, cefalotina, ampicilina, ticarcilina e carbenicilina (ARMSTRONG *et al.*, 2005). Os antibióticos, os antimicrobianos mais utilizados, também são responsáveis por causar danos no meio ambiente, posicionando-se em primeiro lugar na lista dos que mais causam impactos ambientais, com 76,6%, em segundo lugar estão os hormônios e em terceiro, os antidepressivos (BOUND *et al.*, 2006). O contínuo uso desses fármacos permite a acumulação de substâncias nocivas no ambiente aquático, contaminando uma grande parcela dos recursos hídricos, causando a morte de muitos organismos aquáticos e perturbando o fluxo normal do ecossistema (LIU *et al.*, 2012; SEBASTIÃO, 2015).

A fim de atingir um controle mais eficiente para as doenças bacterianas nas pisciculturas, tratamentos alternativos, com menores riscos de prejuízos e proliferação de bactérias resistentes no ecossistema aquático, devem ser incentivados, melhorando a saúde dos peixes e reduzindo os custos na produção (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009).

## 2.8. Óleos essenciais

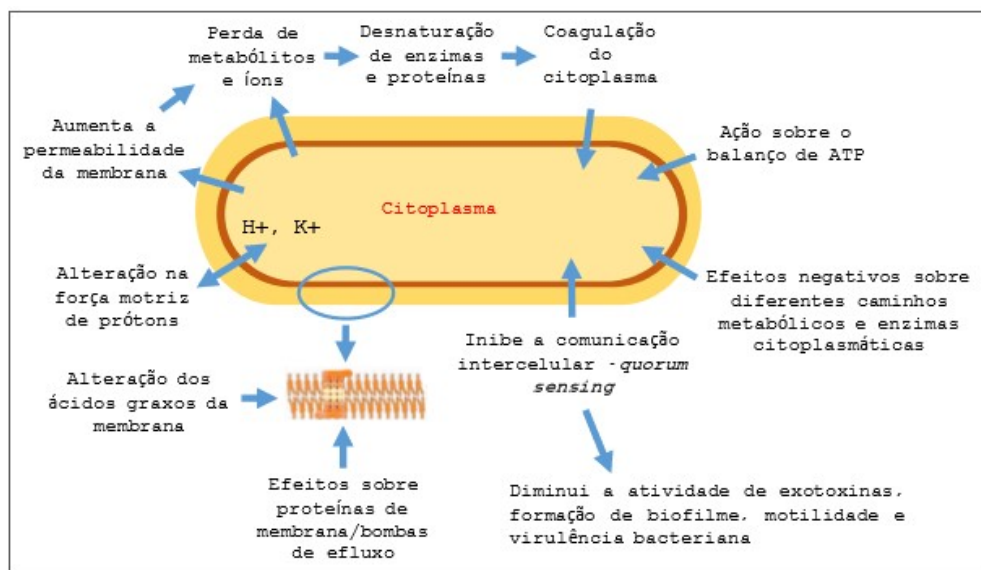
Tratamentos alternativos para o controle de doenças nas pisciculturas estão sendo cada vez mais procurados por representarem menor perigo para o meio ambiente, com baixa toxicidade para mamíferos e serem produtos biodegradáveis, proporcionando assim maior sustentabilidade na produção de peixes (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Os antimicrobianos naturais podem ser implementados na dieta dos peixes, adicionados diretamente na água, em banhos, sprays ou em forma de injeções com finalidade profilática ou terapêutica (BOIJINK *et al.*, 2010).

Considerando a elevada biodiversidade de plantas encontradas no Brasil, mais de 55 mil espécies descritas, é de se esperar um maior interesse no potencial medicinal destas para a população (CARVALHO *et al.*, 2007). Dentre os compostos extraídos das plantas usados na medicina alternativa estão os óleos essenciais, produtos do metabolismo secundário das plantas relacionado com os mecanismos de defesa da planta contra perigos externos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O conhecimento dos benefícios dos óleos essenciais não é um assunto atual, datando de milhares de anos e plenamente utilizados no Egito antigo, China, Índia e Grécia (BRUGALLI, 2003). Apesar dos óleos serem bem conhecidos pelo seu aroma e sabor, ganhando notoriedade no mercado consumidor aromático, o estudo das propriedades antibacterianas dos óleos essenciais teve início em 1881. Porém, a importância que esses produtos têm na medicina ainda não foi totalmente explorado (BURT, 2004).

São compostos naturais voláteis e complexos muito comumente utilizados na conservação de alimentos, como antimicrobianos, analgésicos, sedativos e anti-inflamatórios. (BAKKALI *et al.*, 2008). Já foram observadas as suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiparasitárias, antitoxigênicas, antissépticas e anestésicas (FERNANDES JÚNIOR *et al.* 2014). O poder antimicrobiano e imunoestimulante se dão principalmente pela presença de diversos princípios ativos, cerca de 20 a 60 componentes com diferentes concentrações, como compostos fenólicos, polifenóis, alcalóides, quinona, terpenóides, lectina e polipeptídeos (HARIKRISHNAN *et al.*, 2011). E são os componentes em maiores concentrações que irão caracterizar as funções biológicas dos óleos (BAKKALI *et al.*, 2008).

Essas funções biológicas podem surtir efeitos em diferentes sistemas, nas próprias células patogênicas, no sistema fisiológico e imunológico dos hospedeiros. Um resumo da atuação direta dos óleos sobre a célula bacteriana está expresso na **Figura 18**.



Fonte: SUTILI, 2016.

**Figura 18:** Mecanismos de ação dos óleos essenciais em células bacterianas

Esses compostos ativos, por serem hidrofóbicos, apresentam influência direta com a membrana plasmática de bactérias, causando danos estruturais e funcionais como ruptura da membrana com extravasamentos citoplasmáticos, alterações na atividade de efluxo e alterações nas proteínas da membrana bacteriana, aumentando sua permeabilidade (WALSH, 2000; GOÑI *et al.*, 2009). Além de causarem inativação de enzimas envolvidas na produção de energia e de material genético das bactérias (BURT *et al.*, 2007), lise celular, inibição de mecanismos de resistência e fatores de virulência bacterianos (STAVRI *et al.*, 2007).

A ação imunoestimulante também está agregada nas vantagens do uso desses fitoterápicos para melhorar a defesa não específica dos hospedeiros frente às doenças (CITARASU, 2010). As moléculas dos óleos essenciais podem auxiliar na modulação da resposta imunológica, ativando componentes do sistema imune, aumentam a resposta dos anticorpos, facilitam a atividade de células fagocitárias, alterando a migração dos leucócitos para os tecidos, estimulam as células NK, o sistema complemento e as lisozimas, além de inibirem citocinas pró-inflamatórias, ou seja, melhorando a defesa inata dos peixes (HARIKRISHNAN *et al.*, 2011; SUTILI, 2016).

Por terem ação antibacteriana, os óleos essenciais também influenciam na composição da flora intestinal dos peixes, não só alterando positivamente a morfologia intestinal, como modificando a colonização microbiana ao impedir que linhagens bacterianas maléficas se aderem nas paredes intestinais, reduzindo a capacidade dos patógenos de colonizar o trato digestório (HARIKRISHNAN *et al.*, 2011; FRECCIA *et al.*, 2014). Os OEs também

podem induzir uma maior produção de secreções da mucosa intestinal, alterando as propriedades do ambiente e melhorando a digestão e absorção de nutrientes e assim evitando distúrbios nutricionais (HARIKRISHNAN *et al.*, 2011).

Por isso que diversas espécies de peixes estão sendo tratadas com o uso de fitoterápicos para o controle de bactérias, como *Aeromonas hydrophila*, fungos e parasitos, como *Tricodina* sp. e os indivíduos da classe Monogenea (ANDRADE *et al.*, 2014). A atividade antibacteriana desses óleos não abrange apenas *A. hydrophila*, mas também outras importantes bactérias patogênicas de peixes como: *S. iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Flavobacterium columnare*, *Pseudomonas fluorescens* e *Edwardsiella tarda* (ZILBERGET *et al.*, 2010)

Os óleos essenciais são obtidos de vários órgãos vegetais como flores, frutos, folhas e raízes e sua síntese pode ser realizada de duas formas diferentes, a técnica mais utilizada é por hidrodestilação ou destilação por arraste de vapor e a outra técnica é através de um processo mecânico, sem envolvimento de calor (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Atualmente diversas plantas são utilizadas para a extração dos óleos essenciais, as mais utilizadas estão expressas na

**Tabela 04.**

**Tabela 04:** Principais plantas utilizadas na extração de óleos essenciais

| NOME POPULAR | NOME CIENTÍFICO               |
|--------------|-------------------------------|
| Orégano      | <i>Origanum vulgare</i>       |
| Cravo        | <i>Eugenia caryophyllata</i>  |
| Tomilho      | <i>Thymus vulgaris</i>        |
| Hortelã      | <i>Mentha piperita</i>        |
| Comilho      | <i>Cuminum cyminum</i>        |
| Canela       | <i>Cinnamomum zeylanicum</i>  |
| Manjeriço    | <i>Ocimum basilicum</i>       |
| Gengibre     | <i>Zingiber officinale</i>    |
| Alecrim      | <i>Rosmarinus officinalis</i> |
| Citronela    | <i>Cymbopogon nardus</i>      |
| Coentro      | <i>Coriandrum sativum</i>     |

Fonte: TARCITANO & MESQUITA (2017).

### 2.8.1. Hortelã-pimenta

*Mentha piperita*, conhecida popularmente como hortelã pimenta, pertence a família Lamiaceae, uma espécie híbrida do cruzamento entre hortelã-verde (*Mentha spicata*) e hortelã-da-água (**Figura 19**) (OUMZIL *et al.*, 2002). Esta planta é nativa da Europa e cultivada no mundo todo (GARLET *et al.*, 2007).



Fonte: SCHOPPAN, VISHWA (2016)

**Figura 19:** Hortelã-pimenta (*Mentha piperita*)

Os principais componentes encontrados nesse óleo são: pulegona,  $\alpha$ -pineno, sabineno, limoneno, piperitona,  $\beta$ -pineno, neomentil-acetato, isomentona, isomentol, entre outros e os componentes maioritários são o mentol e mentona (TAVISH; HARRIS, 2002). Já foi apontado propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas, anti-inflamatórias e observado alterações no nível de colesterol e nos parâmetros sanguíneos e imunológicos (HADIAN; GHASEMNEZHAD; RANJBAR, 2008; HARDARI; NOBAKHT; SAFAMEHR, 2010). Sendo o mentol relacionado com o potencial antibacteriano da planta junto com mentona (SINGH *et al.*, 2011).

O poder antibacteriano do óleo pode ser observado por SILVA (2018) onde constatou um maior índice de sobrevivência em peixes alimentados com rações suplementadas com óleo de hortelã pimenta após o desafio com *Streptococcus agalactiae*. Além desta bactéria, outras cepas patogênicas também são alvo do óleo como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenos*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, entre outras (YADEGARINIA *et al.*, 2006).

### 2.8.2. Canela casca

A canela (*Cinnamomun zeylanicum*) apresenta um amplo espectro de uso, é comumente utilizada como uma especiaria na culinária em temperos, como aromatizante e perfumes, porém é pouco mencionada como um instrumento medicinal. Pertence a família Lauraceae, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais com 49 gêneros e aproximadamente 3000 espécies (**Figura 20**) (CASTRO, 2010). Ocorrem em maior número no sudeste e na Ásia oriental, crescendo em locais onde o solo é bem drenado (JANTAN *et al.*, 2008).



Fonte: MENDANHA, RODRIGO (2017)

**Figura 20:** Casca da canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

Sua composição já foi analisada, encontrando mais de 23 componentes, dependendo da parte da planta estudada. O principal componente encontrado é o eugenol, representando 60% da constituição do óleo (LIMA *et al.*, 2006). O poder do eugenol contra os patógenos está na capacidade de realizar a deterioração da parede celular e consequentemente, a lise celular bacteriana (BURT, 2004).

Outro componente importante é o cinamaldeído que apresenta compostos terpenóides ou fenólicos. Estes compostos garantem ao óleo de canela atividades antimicrobianas contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e alguns fungos (CHEN *et al.*, 2016). Além de já ter sido observado atividades anti-inflamatórias e atividades moduladoras da resposta imunológica mediadas por macrófagos (KIM *et al.*, 2010).

### 2.8.3. Coentro

Coentro (*Coriandrum sativum*) é caracterizado como uma hortaliça herbácea da família Apiaceae, com mais de 3.000 espécies, encontrado em regiões tropicais e subtropicais (JOLY, 2002). Seu uso está voltado para o mercado consumidor humano, empregado na culinária, fabricação de perfumes, aromaterapia de certos medicamentos e bebidas alcoólicas (**Figura 21**) (LIMA *et al.*, 2007).



Fonte: KAORI, VIVIAN (2021)

**Figura 21:** Coentro (*Coriandrum sativum*)

As muitas propriedades do óleo essencial de coentro, tanto as sementes quanto outras partes são: antimicrobianos, antioxidantes, hipoglicêmicas, analgésicas, anti-inflamatórias e anticancerígenas (DHANAPAKIAM *et al.*, 2008). O efeito antimicrobiano desse óleo está relacionando com a presença de compostos fenólicos, carotenoides, taninos, flavonoides, saponinas e terpenos (SAKURAI *et al.*, 2016). Mesmo tendo uma complexa composição, o componente predominante é o linalol, um monoterpene alcoólico terciário acíclico (CUNHA, 2013). Desempenha atividades antimicrobianas pela desnaturação de proteínas e desidratação das células patogênicas, surtindo mais efeito em bactérias gram-positivas do que gram-negativas (SOKOVIÉ *et al.*, 2010).

#### **2.8.4. Toxicidade dos óleos essenciais**

A ecotoxicologia é a ciência que estuda e interpreta os agentes potencialmente tóxicos e como estes afetam os organismos, podendo provocar danos através de respostas letais (mortalidade) e subletais, que afetam suas funções fisiológicas (SPARLING, 2016). O efeito tóxico pode estar presente em agentes e produtos de diversas fontes, desde produtos químicos até produtos considerados mais naturais. Um exemplo são as plantas, muito consumidas pela população, usadas de diversas maneiras (in natura, chás e outros produtos) tanto na alimentação, quanto no combate de doenças (BAGATINI, SILVA, TEDESCO, 2007).

Atualmente, têm-se dado muita importância para o uso de plantas com fins terapêuticos, utilizadas por milhares de pessoas. Apesar dessa ênfase medicinal, poucas pessoas conhecem os efeitos tóxicos que algumas dessas plantas podem causar para homens e animais,

sendo importante avaliar seu grau toxicológico (FRANCO *et al.*, 2007).

Para descobrir esse grau toxicológico, inicialmente, é necessário realizar um teste agudo com a finalidade de descobrir a  $CL_{50}$  (Concentração letal média). A  $CL_{50}$  é definida como a concentração de uma substância que causa a mortalidade de metade dos indivíduos da população usada no estudo (OLIVEIRA, 2003). Porém, não é apenas a mortalidade que esses testes visam, mas também procuram observar alterações comportamentais na locomoção, no escape, na alimentação, na reprodução e em outras relações intraespecíficas (DHARA; SAHA; MAITI, 2017).

Dentre os organismos invertebrados não alvos utilizados nos testes toxicológicos pode-se mencionar a *Artemia salina*, muito utilizada por ser altamente sensível, de fácil manuseio e de baixo custo para manutenção (CAVALCANTE *et al.*, 2000). Por serem bem sensíveis, apresentam tolerâncias a fatores ambientais reduzidas ou específicas, onde pequenas variações no meio ambiente já são o suficiente para causar qualquer dano no organismo (ABEL, 1989).

São microcrustáceos da Ordem Anostraca e Família Artemiidae, vivem apenas em lagos e poças com alta salinidade, encontradas em todo o continente e utilizados como alimento para peixes devido a seu fácil cultivo (ROSA *et al.*, 2016). Podem ser considerados ovíparos ou ovovivíparos, assumindo quatro formas em seu ciclo de vida: ovos, cistos, larvas e adultos. Podem produzir centenas de ovos que após a fertilização se transformam em cistos, estágio mais resistente, onde são liberados na água e após a secagem mudam para a fase larval, chamando-os de náuplios e posteriormente, desenvolvem-se em adultos (ABATZOPOLULOS *et al.*, 2010). Os adultos têm seu corpo dividido em três segmentos: cabeça, tórax e abdome, com três olhos e 11 pares de pernas, variando sua coloração com a concentração de sal no ambiente, como pode ser visto na **Figura 22**.



Fonte: MOREIRA, 2013.

**Figura 22:** Microcrustáceo adulto da espécie *Artemia salina*

Já os náuplios inicialmente apresentam apenas um olho fotorreceptor, nadam na coluna d'água usando suas antenas e filtram a água para se alimentarem (MUÑOZ *et al.*, 2008).

## 2.9. Probióticos

A aplicação dos probióticos na aquicultura, como os óleos, é oferecer aos piscicultores um meio de controlar as doenças, utilizando produtos mais ecológicos do que os antibióticos e produtos químicos (HOSEINIFAR *et al.*, 2018). A primeira definição foi feita por FULLER (1989), desde então, o conhecimento acerca dos probióticos e suas ações foram cada vez mais atualizadas. De acordo com a ANVISA (2002), probióticos consistem em microrganismos vivos que, ao serem administrados em quantidades adequadas, beneficiam a saúde dos hospedeiros (humanos ou animais) que os consomem, equilibrando a microbiota natural.

Existem alguns critérios que devem ser seguidos ao denominar algum microrganismo de probiótico, esses critérios são: não causar danos no hospedeiro, ser internacionalmente reconhecido, resistir as diferentes condições encontradas no trato intestinal, como resistir aos processos de digestão, absorção, adsorção e processamentos do hospedeiro, onde há ação do suco gástrico e dos sais biliares (ZUCCOTTI *et al.*, 2008). Precisam se aderir ao muco e ao epitélio intestinal, ser incorporado pela microbiota natural do sistema gastrointestinal e estimular o crescimento de bactérias benéficas no sistema gastrintestinal (KOLIDA; GIBSON, 2007).

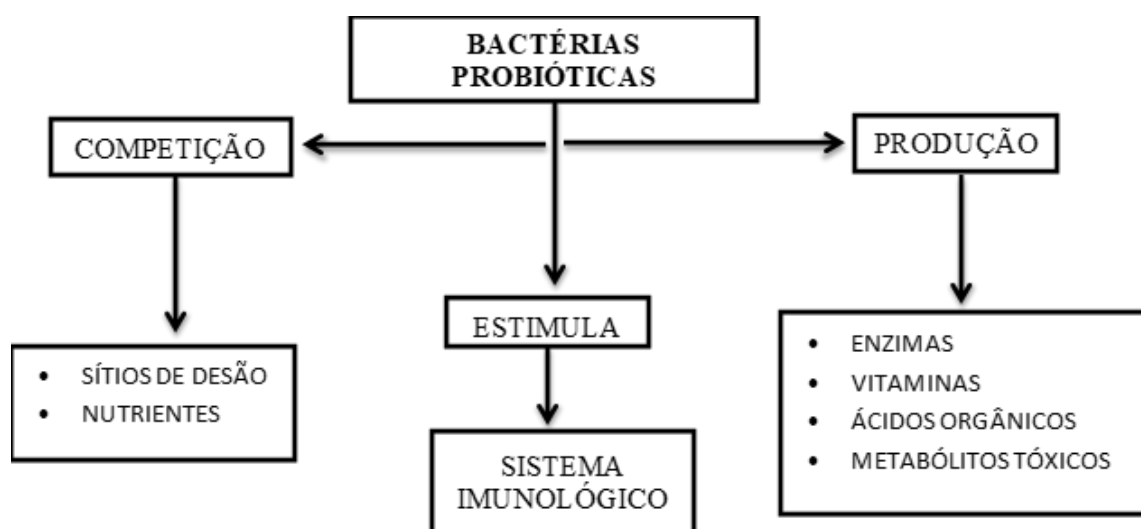
Comercialmente, os probióticos podem ser encontrados nas formas de emulsões líquidas, liofilizadas e microencapsuladas (VIEIRA *et al.*, 2005). Essas formas comerciais necessitam ter viabilidade durante todo o consumo e comprovação *in vivo* e *in vitro* por doses reconhecidas para garantir uma melhor colonização do hospedeiro (NAYAK, 2010). Para isso, a ANVISA (2008) normatizou a concentração mínima de microrganismos probióticos que cada porção de produto deve ter, variando de  $10^8$  a  $10^9$  UFC (Unidades Formadoras de Colônia)

As principais bactérias utilizadas para fins probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Enterococcus* spp, *Bacillus* spp e *Streptococcus* spp (GUPTA; GARG, 2009). Dentre as espécies reconhecidas internacionalmente desses três gêneros estão: *Lb. acidophillus*, *Lb. casei*, *Lb. rhammosus*, *Lb. defensis*, *Lb. paracasei*, *Lb. lactis*, *Lb. crispatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. amylovorus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri*, *Lb johnsoni*, *Lb. salivarius*, *Lb. reuteri*, *Bif. adolescentis*, *Bif. animalis*, *Bif. bifidum*,

*Bif. breve*, *Bif. infantis*, *Bif. longum*, *Ent. faecalis* e *Ent. faecium* (ITSARANUWAT; SHAL-HADDAD; ROBINSON, 2003).

Especificando agora para o uso em peixes, esses suplementos podem ser adicionados na água, na ração ou em alimentos vivos, porém é mais comum e mais eficiente a administração oral (MOURIÑO *et al.*, 2012). Dentre os principais benefícios conferidos pelo incremento dos probióticos nas rações estão: melhoria na digestão e na absorção de nutrientes, maior atividade de enzimas digestivas, ação antagônica contra bactérias patogênicas, produção de metabólitos com função de inibir bactérias maléficas, estímulo do sistema imune e renovação do equilíbrio da microbiota intestinal (CRUZ, 2012; AZEVEDO *et al.*, 2016). A interferência dos probióticos na saúde dos animais pode também estar sendo feita indiretamente ao melhorar as condições do meio aquático externo, mantendo os parâmetros da água os mais estáveis possíveis (CASTRO, 2003).

Para conferir todos esses benefícios, os probióticos lançam diversos mecanismos de ação, agindo em diversos sistemas, mas o local onde se concentra maior atividade probiótica é no sistema digestivo (TORRES, 2014). Os principais mecanismos de ação probiótica foram organizados em forma de esquema na figura abaixo (**Figura 23**).



Fonte: AZEVEDO *et al.*, 2016

**Figura 23:** Mecanismos de ação probiótica

As competições acontecem exclusivamente no trato intestinal, relacionadas tanto na questão nutricional quanto na colonização microbiana. As bactérias probióticas competem com os patógenos pelos sítios de adesão da mucosa intestinal, que ao se ligarem nas vilosidades intestinais evitam a aderência e a colonização das bactérias patogênicas no local (NICOLI; VIEIRA, 2000). Após a colonização das bactérias benéficas outra competição se inicia, a competição por nutrientes presentes no trato intestinal, dificultando que os patógenos oportunistas consigam absorver os nutrientes essenciais para sua manutenção no sistema (TAPIAPANIAGUA *et al.*, 2010).

Diversos produtos sintetizados pelos organismos probióticos, alguns deles com efeito nutricional, como é o caso da síntese de enzimas (amilases e proteases) e vitaminas que auxiliam na digestão e absorção de nutrientes. Outros compostos produzidos apresentam ação bactericida e bacteriostática contra patógenos, como é o das bacteriocinas (SAHU *et al.*, 2008). A estimulação do sistema imunológico é através da liberação de antígenos que ao ser captado pelo sistema imune do hospedeiro, possibilitará uma maior agilidade nas respostas imunológicas frente a outros patógenos também (ZORRIEHZAHRA *et al.*, 2016).

### **2.9.1. Efeitos dos probióticos na imunidade**

O sistema imunológico dos peixes não é muito diferente dos mamíferos, também constituído pela imunidade inata, na qual integra as barreiras físicas, sistema complemento, células fagocitárias e células Natural Killer e constituído pela imunidade adaptativa, onde atuam os linfócitos através de respostas mais específicas (URIBE *et al.*, 2011). Porém, antes mesmo dessas células especializadas começarem a agir, o patógeno primeiramente precisa passar pela primeira linha de defesa, composta pelas brânquias, pele e muco (RIBEIRO; COSTA; LOGATO, 2008).

Quando o sistema imunológico dos peixes está enfraquecido o suficiente para que sua resposta frente aos patógenos não seja eficiente e com isso, não consiga impedir a ocorrência das doenças, é comum a utilização de imunoestimulantes. Os imunoestimulantes são produtos de diversas fontes que podem ser utilizados como aditivos na dieta dos peixes (DIAS *et al.*, 2019). E como o próprio nome já menciona, têm a função de estimular o sistema imunológico dos peixes, aumentando a eficiência dos mecanismos de defesa específicos e não específicos (RINGOT *et al.*, 2007).

Os probióticos podem ser utilizados como imunoestimulantes em pisciculturas. Sua importância está relacionada com o aumento da atividade fagocítica de macrófagos, neutrófilos

e monócitos contra patógenos no intestino, ativando-os mais rapidamente, além de induzir uma maior produção de linfócitos, anticorpos (imunoglobulinas) e lisozimas (NAKANDAKARE *et al.*, 2013). Outro papel dos probióticos na modulação do sistema imune é através da ação de citocinas, estas produzidas em maior escala pelas células imunes ao serem incentivadas pelos aditivos alimentares, com a função exclusiva de se defender contra infecções causadas por patógenos (TAN *et al.*, 2019).

### **2.9.2. Efeitos dos probióticos no estresse**

O estresse na criação de peixes pode surgir em diversas situações, principalmente provindas de práticas de manejo e transporte inadequadas, em ocasiões onde o ambiente em que vivem não esteja em melhores condições ou quando há superlotação de peixes no local (LARA-FLORES *et al.*, 2003). Esses fatores estressantes causam diversas alterações na saúde do peixe, pois afetam seu desenvolvimento e seu crescimento, causando prejuízos e perdas na produção. Os efeitos do estresse nos peixes podem ser observados tanto nos padrões sanguíneos, com aumento nos níveis de cortisol e glicemia, quanto fisicamente, comprometendo sua reprodução, diminuindo a taxa de crescimento e os tornando mais vulneráveis a doenças, além de serem observadas mudanças comportamentais (ISHIKAWA; RANZAVI-PAIVA; LOMBARDI, 2008).

É por isso que o uso de probióticos na produção de peixes não tem apenas o intuito de evitar e controlar doenças no meio, como também pode ser utilizado como uma ferramenta para melhorar a resposta dos peixes frente a agentes estressores (GONÇALVES *et al.*, 2011). Em pesquisas que analisaram os efeitos desses suplementos microbianos frente a fatores estressantes, foi possível observar um aumento no número de eritrócitos, linfócitos, monócitos, outras células fagocitárias e um aumento da concentração de hemoglobina presente nas células, mantendo assim o sistema imune ativo para evitar que qualquer patógeno oportunista se aproveite da situação de maior fragilidade provocada pelo estresse (NAKANDAKARE, 2013).

Outros resultados positivos da suplementação observados em análises hematológicas são: diminuição do nível de cortisol plasmático e diminuição da glicemia. Já fisicamente, há um aumento na taxa de crescimento e desenvolvimento dos peixes, possibilitando uma maior engorda e uma maior resistência a doenças que consequentemente trará menor número de mortes animais e menores prejuízos econômicos (FARAMARZI *et al.*, 2011).

### 2.9.3. Efeitos dos probióticos no trato gastrointestinal

A integridade do sistema digestivo é trivial para a sobrevivência de muitos animais, principalmente os peixes. Esse sistema tem como principal tarefa realizar a digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes. Porém também são responsáveis por desencadear defesas contra agressores externos (BOURLIOUX *et al.*, 2003). Para conseguir desempenhar todas essas atividades, os componentes do trato intestinal (células, nutrientes e microbiota) precisam estar sempre em equilíbrio e mantendo interações entre si (MAGNADOTTIR, 2010). Os probióticos auxiliam na manutenção do equilíbrio, estabelecendo uma microbiota intestinal benéfica para o hospedeiro e uma renovação celular constante (LAZADO; CAIPANG, 2014).

Para estabelecer uma microflora benéfica é necessário que as bactérias probióticas ao chegarem no trato gastrointestinal dos peixes, através da suplementação desses aditivos na dieta, ocupem os sítios de adesão dos enterócitos, atuando assim como uma barreira física contra os microrganismos patogênicos (FURLAN, 2005). Outra barreira física existente no intestino que também tem a função de dificultar a colonização de patógenos no ambiente é o muco, produzido pelas células caliciformes com função complementar de lubrificar e proteger contra toxinas e outras agressões químicas (MELLO *et al.*, 2013).

Os benefícios do consumo dos probióticos para a produção do muco é explicado pelo aumento das células epiteliais e células caliciformes, incentivando renovações celulares com essas determinadas características vantajosas (SILVA *et al.*, 2015). Alterações na arquitetura da parede intestinal também fazem parte dos mecanismos de ação dos probióticos. Dentre essas alterações está o aumento da altura e largura das vilosidades intestinais e o espessamento do epitélio intestinal que ao aumentar a superfície da mucosa intestinal permite maior absorção de nutrientes como aminoácidos e vitaminas (SHAHKAR *et al.*, 2015).

Portando, todas as vantagens da implementação dos probióticos, já elucidadas anteriormente, estão associadas direta ou indiretamente com o epitélio intestinal e com a microbiota natural, onde as principais atividades locais consistem em exclusões dos patógenos através de competições pelos sítios ativos dos enterócitos e também pelos nutrientes presentes neste sistema (VARALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008).

### 2.9.4. Bactérias ácido-láticas (BALs)

Diversas linhagens de bactérias ácido-láticas são classificadas como probióticas por apresentarem ação inibitória contra bactérias patogênicas. Esse potencial inibitório está correlacionado com a fabricação de produtos da fermentação e de subprodutos secundários do metabolismo, como peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (ONILUDE *et al.*, 2005; SAYES *et*

*al.*, 2018).

São geneticamente variadas, assumindo a forma de cocos, bacilos ou bastões regulares e irregulares, encontrados em produtos lácteos, bebidas, carnes, legumes e na microbiota natural do trato digestivo e urogenital de animais (JERONYMO-CENEVIVA *et al.*, 2014). Dentre suas principais características estão: gram-positivas, não esporogênicas, catalase e oxidase negativas, crescem em anaerobiose, são aerotolerantes, sobrevivem a pH baixo e são fermentadoras de açúcares. São nutricionalmente exigentes, necessitando frequentemente nutrientes como aminoácidos e vitaminas para seu crescimento (WALSTRA; WOUTERS; GEUTRS, 2006).

#### 2.9.5. Produção de ácido lático

Têm como principal produto do metabolismo o ácido lático, um ácido orgânico vindo da fermentação de açúcares como substratos. Outros produtos dessa fermentação são: ácido cítrico, o ácido glutâmico e o glicerol (OLIVEIRA *et al.*, 2018a). De acordo com a produção desses ácidos, as bactérias ácido-láticas podem ser divididas em dois grupos: homofermentativas e as heterofermentativas. As bactérias que produzem o ácido lático como principal produto são chamadas de homofermentativas e as heterofermentativas produzem não só o ácido lático como também dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (GONÇALVES, 2009).

Os principais gêneros de bactérias ácido-láticas são: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, entre outros (TODAR, 2012). O gênero mais conhecido e utilizado na constituição de probióticos é o *Lactobacillus*, pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae, com 106 espécies já descritas (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). Assumem a forma de bastonetes, são mesófilas (crescem em temperatura por volta de 30°C), não esporuladas, desenvolvendo-se no intestino delgado, onde participam da microbiota natural, mantendo-a equilibrada e livre de doenças (ROBINSON, 2002). Dentre o gênero *Lactobacillus*, as espécies *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* e *Lb. salivarius* são consideradas homofermentativas e as espécies *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum* e *Lb. reuteri* são heterofermentativas (SALMINEN, VON WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

#### 2.9.6. Produção de bacteriocinas

As bacteriocinas nada mais são do que peptídeos antimicrobianos, que atuam contra

microrganismos patogênicos e não desejáveis (MARCOS *et al.*, 2013). São sintetizadas ribossomicamente, com modificações pós-traducionais, apresentam efeitos bactericidas e bacteriostáticos, principalmente contra bactérias gram negativas (VÁSQUEZ *et al.*, 2009).

A amplitude de seu poder antagônico pode estar relacionada com os diferentes tratamentos que tanto as bactérias como as bacteriocinas são acometidas, podendo encontrar na forma liofilizada, concentrada, purificada ou neutralizada, onde já foi observada que na forma concentrada em sobrenadante apresentou maior ação antimicrobiana (GUTIÉRREZ RAMÍREZ; MONTOYA CAMPUZANO; RUIZ VILLADIEGO, 2005). A vantagem do uso de bacteriocina está na sua estrutura não tóxica, resistente a temperaturas mais elevadas e a pH mais ácido, com fácil digestão e sem riscos de contaminação alimentar com seus resíduos (LETHBRIDGE, 2002).

Os mecanismos de ação das bacteriocinas podem se dividir em duas fases, a primeira consiste na ligação das bacteriocinas aos receptores da membrana celular da bactéria alvo e a segunda fase envolve alterações na própria linhagem alvo, trazendo consequências letais para esta (DESMAZEAUD, 1997). O principal alvo das bacteriocinas é a membrana citoplasmática, nesta ocorre à formação de poros com a perda de íons de potássio, de ATP e alguns aminoácidos, causando uma perda no seu potencial de membrana e uma queda na síntese de DNA, RNA e proteínas e por fim sua morte (KLAENHAMMER, 1993).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a inclusão de óleos essenciais e probióticos na alimentação de Tilápias-do-Nilo para o controle da infecção e atenuação dos malefícios causados pela bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila*.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Analisar os efeitos fisiológicos e imunológicos dos probióticos e dos óleos essenciais nos peixes submetidos à infecção experimental pela *Aeromonas hydrophila*.
- Avaliar a sobrevivência, o crescimento, o desempenho, as alterações nos parâmetros hematológicos e os sintomas clínicos dos peixes após o desafio bacteriano.

## **CAPÍTULO 1**

**ENSAIOS  
*IN VITRO***



## 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar o poder antagonístico de três óleos essenciais (canela casca, hortelã pimenta e coentro erva) contra o crescimento *in vitro* da bactéria *Aeromonas hydrophila*.
- Selecionar para uso *in vivo*, dentre os três óleos testados, o óleo essencial que apresenta maior potencial antagonístico.
- Avaliar o antagonismo de quatro linhagens isoladas probióticas adquiridas comercialmente (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bacillus clausii*) e de dois pools probiótico (Flora 5® e TROPICAL PRO DEFENCE ®) contra o patógeno *Aeromonas hydrophila*
- Selecionar para uso *in vivo* o probiótico (isolado ou pool) com maior poder antagonístico dentre aqueles testados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento *in vitro* foi realizado nas dependências da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Meio Ambiente), utilizando o laboratório de microbiologia ambiental.

### 2.1. ENSAIOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS

#### 2.1.1. AQUISIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais de canela casca (*Cinnamomum verum*), coentro erva (*Coriandrum sativum*) e hortelã pimenta (*Mentha piperita*) testados contra a bactéria patogênica de peixe *Aeromonas hydrophila* foram obtidos comercialmente. Os óleos de canela casca (lote: BSA, FEV/22) e hortelã pimenta (lote: HSA, AGO/22) foram adquiridos da marca Quinari e o óleo coentro erva (Lote: 15201286, 05/2021) foi adquirido da marca Oshadhi.

#### 2.1.2. ATIVAÇÃO DA BACTÉRIA PATOGENICA

A bactéria *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) utilizada foi cedida pela “Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia”. Inicialmente foi cultivada em Caldo Triptona de Soja Agar (TSA) 24 horas antes da realização dos testes de inibição e incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Com o auxílio do aparelho Densimat (BioMerieux) foi padronizada a concentração inicial da bactéria através do método de suspensão direta em tubos com 5 mL de solução salina (NaCl 0,9%), obtendo como concentração final da solução  $1 \times 10^8$  UFC/mL.

### 2.1.3. ENSAIO ANTAGÔNICO POR DIFUSÃO EM DISCO

Primeiramente, em placas de Petri com meio Mueller Hinton Agar foi realizado o espalhamento da concentração inicial de *Aeromonas hydrophila* ( $1 \times 10^8$ ) (ATCC 7966), obtida na etapa anterior, por toda a placa com ajuda de um swab estéril. Logo após, discos de papel-filtro estéreis de 6 mm de diâmetro foram inseridos no meio das placas para consecutivamente adicionar 5  $\mu$ l de óleo essencial. Os testes para cada óleo foram realizados em triplicata, com apenas um óleo essencial por placa. Após a montagem dos testes, as placas foram incubadas à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas, para posterior leitura do diâmetro dos halos de inibição com auxílio de uma régua milimétrica.

Os valores dos halos de inibição foram utilizados para classificar a sensibilidade dos óleos testados frente ao patógeno, utilizando padrões adotados por Ponce *et al.* (2003) (**Tabela 05**). Os tamanhos dos halos foram comparados com o diâmetro do controle positivo no qual foi inserido discos comerciais de florfenicol, antibiótico muito utilizado para tratar enfermidades em peixes, na concentração de 30  $\mu\text{g}$ /disco. Os óleos classificados como sensíveis tiveram o tamanho do halo igual ou um pouco maior que o controle positivo, já os classificados extremamente sensíveis tiveram o tamanho do halo muito maior que do florfenicol.

**Tabela 05:** Classificação da sensibilidade dos óleos essenciais através do tamanho dos seus halos

| SENSIBILIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS |                        |
|------------------------------------|------------------------|
| CLASSIFICAÇÃO                      | TAMANHO DOS HALOS (MM) |
| Não sensível                       | $\leq 10$              |
| Sensível                           | 11 – 20                |
| Muito Sensível                     | 21-34                  |
| Extremamente sensíveis             | $\geq 35$              |

Fonte: Ponce *et al.* (2003)

### 2.1.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) COM TTC

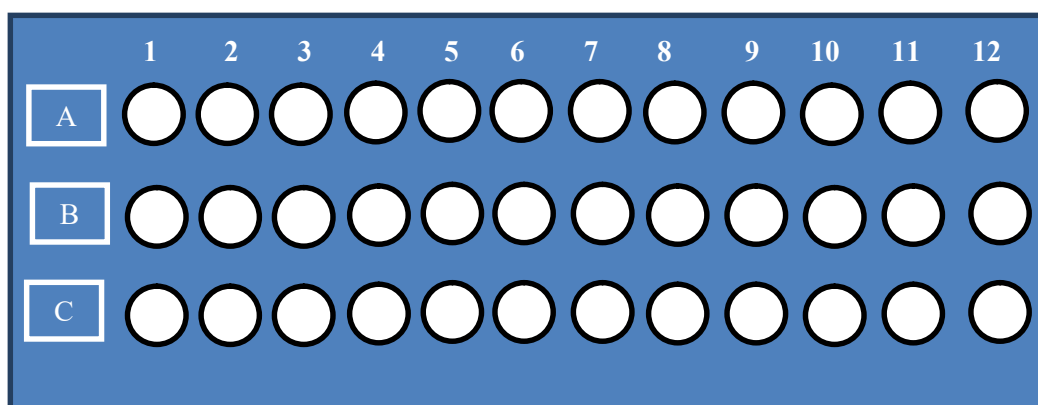
Foram utilizados os mesmos três óleos essenciais do teste de difusão em disco (canela casca, coentro erva e hortelã) em diferentes concentrações para determinar a menor concentração dos óleos que consegue inibir a bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila*.

Os três óleos essenciais foram diluídos doze vezes em caldo Triptona de Soja (TSB) com adição de 1% de Tween 80. A bactéria foi previamente semeada em Caldo Triptona de

Soja Agar (TSA), incubadas a 37°C por 24 horas. Com o auxílio do aparelho Densimat (BioMerieux) foi padronizada a concentração inicial da bactéria em  $10^8$  em TSB (0,015 %). Da concentração inicial, 1 ml foi retirado e colocado em 9 mL de TSB mais água peptonada.

Em uma placa de 96 poços, nos poços de 1 a 12 foram adicionados 100 µL do inóculo (bactéria + meio de cultura) e em cada poço desta sequência foram distribuído 100 µL das 12 diluições dos óleos essenciais. Esse esquema foi realizado em triplicata nas colunas (A-B-C) (**Figura 24**).

No controle negativo foi pipetado 100µl de Caldo TSB mais 100 µl do inóculo, já no controle positivo foi pipetado 100µl do inóculo mais 100 µl do antibiótico Clorofenicol (1%), ambos em triplicata também. As concentrações de cada poço se encontram na **Tabela 06**.



**Figura 24:** Esquematização das sequências de poços (1-12) e das repetições (A-B-C) utilizadas no teste CIM em um placa de 96 poços.

**Tabela 06:** Concentrações correspondentes as 12 diluições para cada óleo essencial.

| REPETIÇÕES<br>TRIPLICATA | DILUIÇÕ<br>ES | CONCENTRAÇÕES (mg/mL) |
|--------------------------|---------------|-----------------------|
| A – B – C                | 1             | 50                    |
|                          | 2             | 25                    |
|                          | 3             | 12,5                  |
|                          | 4             | 6,25                  |
|                          | 5             | 3,125                 |
|                          | 6             | 1,5625                |
|                          | 7             | 0,78125               |
|                          | 8             | 0,390625              |
|                          | 9             | 0,1953125             |
|                          | 10            | 0,0976563             |
|                          | 11            | 0,0488283             |
|                          | 12            | 0,0244141             |

Após a montagem, as placas foram levadas a uma estufa à 37°C por 24 horas, depois desse

tempo 20 uL de Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio (TTC) foi adicionado em cada um dos poços, que consiste em uma solução aquosa utilizada como um indicador de crescimento microbiano, na qual em presença bacteriana altera a cor da solução, devido a redução do produto pelos microrganismos, formando trifenílformazana de cor avermelhada (BELOTI; VANERLI *et al.*, 1999; KENNOR *et al.*, 1961).

#### **2.1.5. TESTE DE TOXICIDADE PARA *Artemia salina***

Ensaio para determinar a toxicidade dos óleos de canela casca, coentro erva e hortelã-pimenta foram realizadas com náuplios de *Artemia salina*, seguindo a metodologia adaptada de VANHAECKE *et al.* (1981). Primeiramente, cistos de *A. salina* foram colocados em solução salina artificial (30g/L de sal marinho) para eclodir, por 24 horas, com aeração constante e com a temperatura entre 22-29°C.

As concentrações dos três óleos essenciais testadas variaram de 10 a 1000 µg/mL. Essas concentrações foram diluídas em solução salina artificial (30g/L de sal marinho) e cada concentração foi distribuída em uma placa de cultivo de 12 poços. A placa controle consistiu em apenas em solução salina artificial (30g/L de sal marinho). Após a eclosão dos náuplios, dois dos indivíduos foram adicionados em cada poço, totalizando 24 náuplios por placa. A contagem dos indivíduos vivos e mortos ocorreu em 24 e 48 horas após a montagem dos testes e só após a contagem que conseguiu calcular a CL50.

## **2.2. ENSAIOS COM PROBIÓTICOS**

### **2.2.1. AQUISIÇÃO DOS PROBIÓTICOS**

Dentre as linhagens probióticas utilizadas nos testes, quatro espécies isoladas (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bacillus clausii*) foram adquiridas comercialmente de farmácias de manipulação. E mais dois produtos (Flora 5® e TROPICAL PRO DEFENCE ®) comprados liofilizados. O produto FLORA 5® é comercializado em farmácias de manipulação e vendido para o uso humano, sua composição contém os respectivos microrganismos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*. Já o produto TROPICAL PRO DEFENCE ® é vendido na forma de ração para tratamentos em peixes de aquários, apresenta em sua constituição endósporos viáveis de *Bacillus subtilis*.

### 2.2.2. ATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS

As bactérias ácido-láticas, tanto as isoladas quanto em forma de pool, foram ativadas semanalmente, antes da realização dos testes, em tubos contendo 5 mL de leite em pó (10%), em seguida foram levadas à uma estufa com temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Ao ativar o probiótico TROPICAL PRO DEFENCE®, foi necessário triturar e homogeneizar as unidades que compunham o produto, já que estava em forma de pequenos grãos.

Em cada ativação, medições no pH foram feitas em 24, 48 e 72 horas para confirmar a atividade das bactérias no leite através da acidificação do meio e também observando se houve ou não coagulação do leite, idealizando um pH de 5-4 e leite em estado de coagulação ótimo para prosseguir com os testes.

### 2.2.3. ATIVAÇÃO DA BACTÉRIA PATOGÊNICA

O processo da ativação da bactéria patogênica foi similar ao utilizado nos ensaios com os óleos essenciais (Tópico 1.2.), ajustando a concentração inicial da solução para  $1 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ .

### 2.2.4. ENSAIO ANTAGÔNICO POR DIFUSÃO EM AGAR

A atividade inibitória das linhagens probióticas escolhidas foram testadas em três diferentes maneiras: as bactérias apenas crescidas no leite, o sobrenadante resultante da centrifugação do leite com as cepas e o concentrado do sobrenadante com gás nitrogênio. Os três tratamentos probióticos: crescidos em leite (Tratamento A), apenas os sobrenadantes (Tratamento B) e os sobrenadantes concentrados em nitrogênio (Tratamento C), as identificações criadas e as respectivas linhagens estão resumidos na **Tabela 07**.

**Tabela 07:** Organização dos três tratamentos

| LINHAGENS                       | TRATAMENTO<br>A | TRATAMENTO<br>B | TRATAMENTO<br>C |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 1 A             | 1 B             | 1 C             |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i>  | 2 A             | 2 B             | 2 C             |
| <i>Lactobacillus fermentum</i>  | 3 A             | 3 B             | 3 C             |
| <i>Bacillus clausii</i>         | 4 A             | 4 B             | 4 C             |
| Flora 5®                        | 5 A             | 5 B             | 5 C             |
| TROPICAL PRO DEFENCE®           | 6 A             | 6 B             | 6 C             |

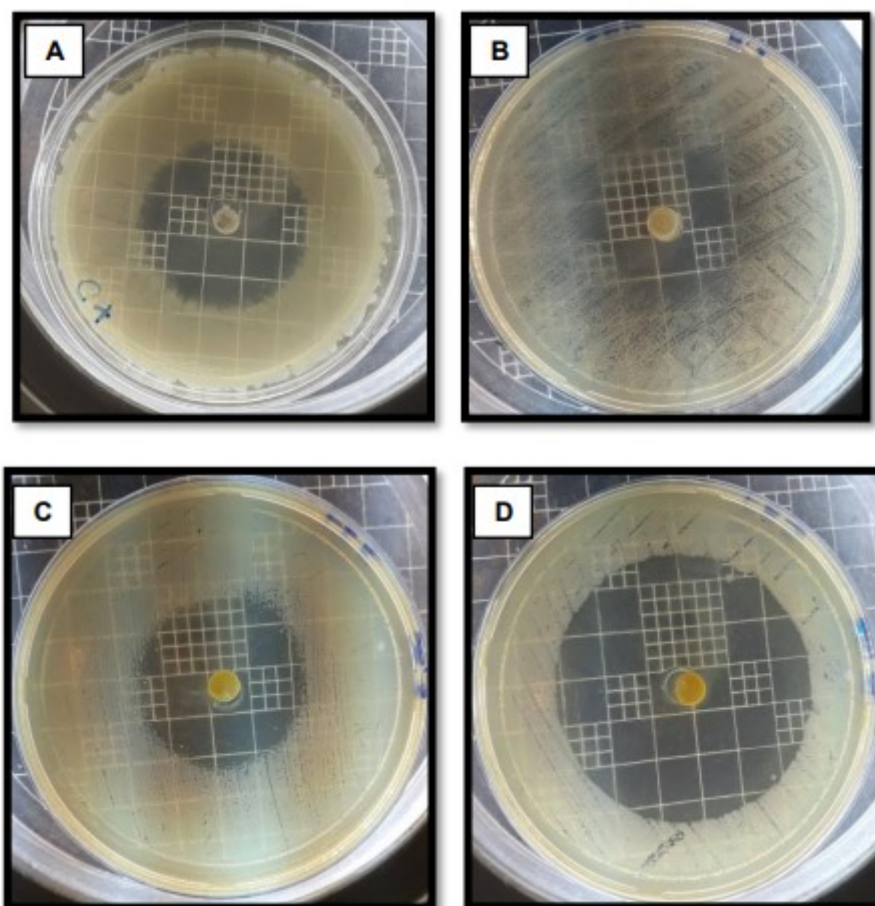
Em placas de petri (9 cm) a bactéria *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) foi inoculada a partir da concentração inicial em solução salina em meio TSA (Tripitona soja agar) na proporção de 100µL de cultura bacteriana para 100mL de meio. Após a solidificação do meio de cultura com as bactérias, poços com 5mm de diâmetro foram formados com ajuda de pipetas Pasteur esterilizadas. Nesses poços foram introduzidos entre 80 µL de bactérias ácido-ácido láctica, reservando um poço da placa para cada linhagem nos três modos diferentes, incubadas à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas para, posteriormente, proceder com as análises dos resultados, medindo os halos de inibição com um régua milimétrica e os comparando com os halos gerados no controle positivo com um disco de Florfenicol®.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. ENSAIO COM ÓLEOS ESSENCIAIS

##### 3.1.1. ENSAIO ANTAGÔNICO POR DIFUSÃO EM DISCO

Os três óleos usados neste teste apresentaram efeitos antagônicos contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*, porém com graus diferentes de inibição (**Figura 25**). Essas diferenças na inibição podem ser observadas através da medição das zonas de inibição, onde o óleo de canela casca conseguiu produzir halos com maiores diâmetros, seguido pelo óleo de coentro erva e por último, o óleo de hortelã pimenta foi o que apresentou menores halos. Em comparação com o efeito antagônico do antibiótico usado (florfenicol) como controle, apenas o óleo de canela conseguiu formar halos de inibição com maiores diâmetros do que o florfenicol. As médias dos halos de cada óleo estão contidas na **Tabela 08**.



**Figura 25:** Halos de inibição formados pelos óleos essenciais no crescimento da bactéria *Aeromonas hydrophila*. **A:** Controle positivo. **B:** Óleo essencial de Hortelã-pimenta. **C:** Óleo essencial de Coentro erva. **D:** Óleo essencial de Canela casca

**Tabela 08:** Média dos halos de inibição (mm) produzidos pelo potencial antagônico dos óleos essenciais frente à *Aeromonas hydrophila*.

| ÓLEOS ESSENCIAIS | MÉDIA DOS HALOS (mm) |
|------------------|----------------------|
| Canela casca     | 49 ± 5,5             |
| Coentro erva     | 38 ± 5,7             |
| Hortelã-pimenta  | 29 ± 4,0             |

Com a comparação dos halos de inibição dos três óleos e do antibiótico, pode-se afirmar que o óleo de canela casca obteve o título de melhor antagônico dentre os outros óleos, ultrapassando também o antibiótico. A liderança do óleo essencial de canela não foi apenas observada neste trabalho, como também no trabalho de HUANG *et al* (2017), na qual, dentre

11 óleos essenciais (Anis estrelado, Dente de alho, Artemísia, Manjerição, Canela, Orégano, Tomilho, Alecrim, Teabush, Pimenta preta e Casca de canela) testado contra a bactéria *Aeromonas veronii* (isolado de carpa da espécie *Ctenopharyngodon idellus*), o óleo de canela casca também foi o que mais demonstrou atividade antimicrobiana, porém com a formação de um halo de inibição (21,7 mm) muito menor que o formado neste trabalho, o que pode-se entender que o óleo de canela apresenta variações no seu potencial antagônico em diferentes espécies de um mesmo gênero de patógeno.

Na pesquisa de STARLIPER *et al.* (2013) pode-se perceber outra variação no potencial antagônico explicado não só pela utilização de outra espécie de patógeno (*A. Salmonicida*) mas como também pela seleção de diferentes estruturas vegetais da planta canela para extração do óleo essencial, obtendo como resultado uma maior zona de inibição no teste usando o óleo da casca de canela (56 mm) em comparação com a zona de inibição no teste usando o óleo da folha de canela (27 mm). Portanto, as diferenças nas atividades inibitórias podem estar relacionadas a composição dos princípios ativos presentes nos óleos, encontrando estes em diferentes proporções em distintas estruturas vegetais das plantas e como consequência, modificações nos padrões de inibição dos óleos essenciais nos patógenos.

A análise dos halos também permitiu classificar os três óleos quanto a sensibilidade frente à bactéria patogênica. Essa classificação está apresentada na **Tabela 09**, onde nota-se que, o óleo de canela casca além de possuir maior efeito antagônico também consente a bactéria patogênica uma maior sensibilidade aos seus princípios ativos.

**Tabela 09:** Classificação da sensibilidade dos óleos frente a bactéria *Aeromonas hydrophila*

| ÓLEOS ESSENCIAIS | NÍVEL DE SENSIBILIDADE |
|------------------|------------------------|
| Canela casca     | Extremamente sensível  |
| Coentro erva     | Extremamente sensível  |
| Hortelã-pimenta  | Muito sensível         |

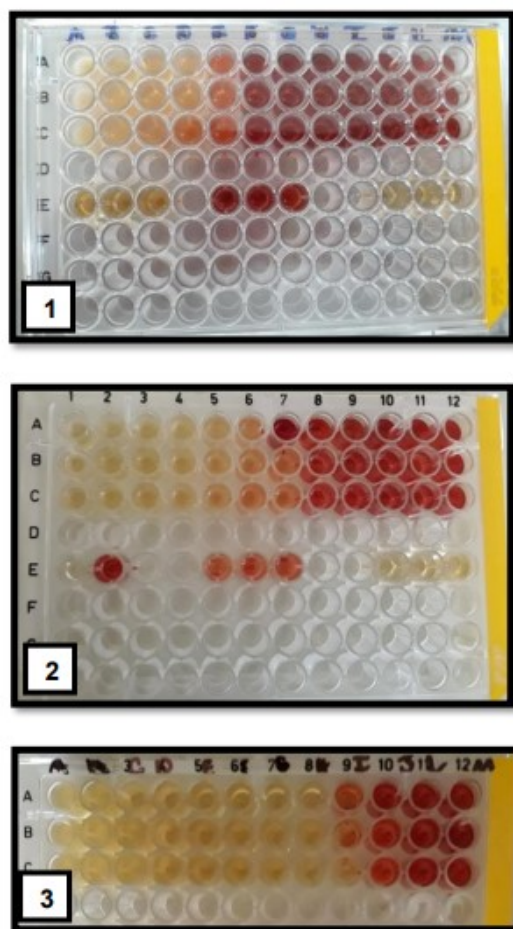
A alta sensibilidade da bactéria *Aeromonas hydrophila* frente aos óleos essenciais já foi observada em outras pesquisas. Como é o caso de YILDIRIM; TURKER (2018), que também verificaram o poder inibitório dos óleos canela casca, hortelã pimenta e coentro erva contra a mesma bactéria patogênica (*Aeromonas hydrophila*), se mostrando sensível contra os três óleos testados. Porém o que difere a pesquisa dos dois autores com a pesquisa presente, é que, nos testes por difusão em ágar de YILDIRIM; TURKER (2018), o óleo de hortelã pimenta apresentou maior potencial inibitório (com zona de inibição de 40 mm) do

que o óleo de coentro erva (com zona de inibição de 30mm) o que neste caso inverte a sensibilidade deles, tornando o hortelã pimenta um agente que causa uma extrema sensibilidade ao patógeno.

O óleo essencial de canela não apresenta efeitos inibitórios apenas contra o patógeno *Aeromonas hydrophila*, como também foi reportado a presença de atividades inibitórias contra outros importantes patógenos presentes na água e alimentos que contaminam tanto animais quanto seres humanos. Como é o caso da pesquisa feita por SILVEIRA (2012), que realizou testes antagônicos usando o óleo essencial de canela casca contra diversas bactérias patogênicas (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica*), resultando em atividades inibitórias moderadas contra a maioria das bactérias, apresentando uma variância de 10,4 a 14 mm de diâmetro de inibição.

### 3.1.2. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) COM TTC

Nos testes, a concentração inibitória mínima foi de 6250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para hortelã-pimenta, 1562,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para coentro erva. Em relação ao óleo de canela casca, foi verificado que o CIM ideal foi de 390,625  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Esses valores de CIM foram apurados através do uso do reagente TTC que deixa a solução avermelhada com a presença de crescimento bacteriano (**Figura 26**).



**Figura 26:** CIM obtido pela observação da reação do composto TTC ao crescimento bacteriano.

Em relação aos valores de CIM dos óleos essenciais, BUSSMANN *et al.* (2010) afirmou que valores de CIM abaixo de  $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$  indicam forte atividade antimicrobiana. Com isso pode-se discutir que os óleos essenciais de coentro e canela apresentam um grande potencial antimicrobiano, tendo o óleo de canela casca a menor concentração capaz de inibir a bactéria patogênica, porém o óleo de hortelã pimenta se mostrou com uma atividade antimicrobiana mais baixa que os outros dois óleos. Esses resultados complementam os resultados dos testes por difusão em disco, correlacionando os maiores halos feitos pelo óleo canela casca com a menor concentração inibitória do mesmo.

O valor do CIM do óleo essencial de canela encontrado para *Aeromonas hydrophila* é similar com o valor de CIM encontrado no trabalho de PARASA *et al.* (2012), onde utilizou extrato de canela casca contra o mesmo patógeno, obtendo CIM de  $312,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , além visualizar atividades inibitórias e encontrar valores de CIM para outras bactérias que comprometem seriamente a criação de peixes (*Aeromonas salmonicida* e *Edwardsiella tarda*).

Os valores de CIM para essas outras duas bactérias foi de  $78,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , significando uma melhor atividade antagonica contra *Aeromonas salmonicida* e *Edwardsiella tarda* em comparação com *Aeromonas hydrophila*. Porém essa similaridade não foi percebida no estudo de ALVES (2014) que ao investigar a ação do óleo de canela contra *Aeromonas hydrophila* obteve uma CIM muito menor ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Essa divergência entre valores do CIM pode estar ligada com discrepâncias na concentração dos seus compostos majoritários ou discrepâncias nas interações com os outros compostos também presentes nos óleos essenciais, resultando em diminuição ou aumento da ação antibacteriana (BASSOLÉ *et al.*; 2010).

Foi devido a isso que YIN *et al.* (2020) quis pesquisar sobre a importância do composto cinamaldeído, principal constituinte do óleo essencial de canela. Essa pesquisa se deu através da avaliação do antagonismo do cinamaldeído frente a oito linhagens de *A. hydrophila* isoladas de diferentes lagoas. Através dessa avaliação conseguiu descobrir a concentração inibitória mínima contra as cepas, ficando entre 128 a  $512 \mu\text{g mL}^{-1}$  e assim, evidenciando que tanto o composto sozinho como a interação desse com outros compostos do óleo essencial apresentam poder antagonico contra a bactéria patogênica. ALSAID *et al.* (2010) testemunhou a ação inibitória de óleos essenciais contra outra bactéria patogênica de peixes (*Streptococcus agalactiae*), na qual o óleo de canela também se sobressaiu na inibição.

Com isso, foi possível chegar a conclusão de que a determinação da CIM é importante para indicar quais óleos essenciais e extratos das plantas são bem ativos, quais que possuem maiores propriedades antibacterianas e também para determinar a concentração efetiva de uma substância terapêutica.

### 3.13. TESTE DE TOXICIDADE PARA *Artemia salina*

Para considerar um composto ativo ou um extrato vegetal tóxico para *Artemia salina* precisa ter a  $CL_{50}$  menor que  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  ou menor que  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (MEYER *et al.*, 1982). Outro meio de avaliar a toxicidade é através da classificação feita por DONABELA (1997), que considera um produto altamente tóxico quando  $CL_{50} \leq 80 \text{ mg L}^{-1}$ , moderadamente tóxico para  $80 \text{ mg L}^{-1} \leq CL_{50} \leq 250 \text{ mg L}^{-1}$  e levemente tóxico ou atóxico quando  $CL_{50} \geq 250 \text{ mg L}^{-1}$ . A  $CL_{50}$  para os óleos essenciais de canela casca, coentro erva e hortelã-pimenta foram respectivamente de  $50 \mu\text{g/mL}$ ,  $30 \mu\text{g/mL}$  e  $20 \mu\text{g/mL}$ . De acordo com os dois modelos com valor de referência citados, constatou que todos os três óleos testados se apresentaram como altamente tóxicos para o organismo não alvo, diferenciando-os quanto ao nível de toxicidade apresentada. Comparando os três resultados, o óleo de canela foi o que apresentou

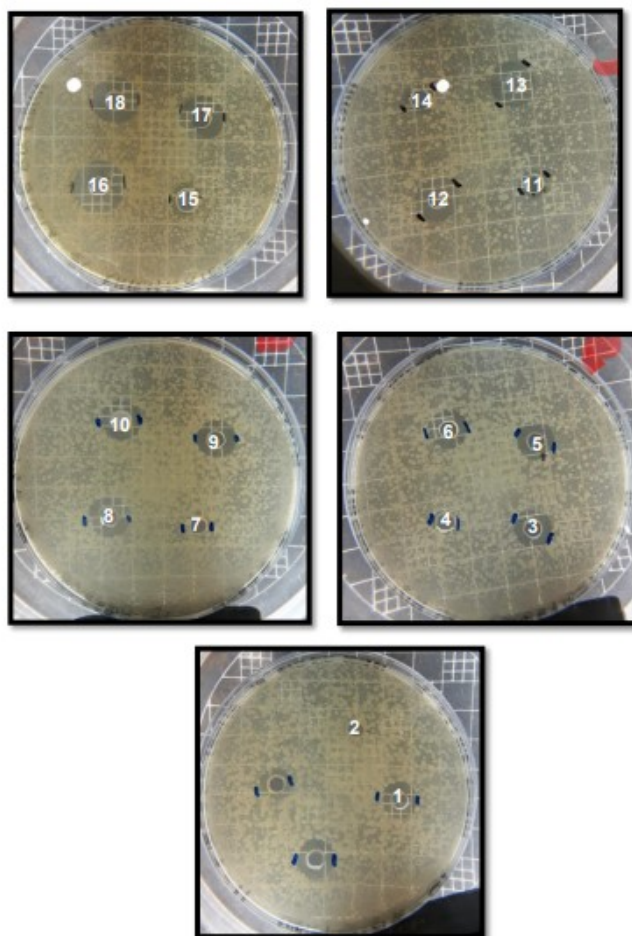
maior CL<sub>50</sub>, ou seja, é o óleo com menor atividade tóxica para *A. salina*.

O resultado para o óleo essencial de canela diferiu completamente dos resultados da pesquisa de SANTOS *et al.* (2020), na qual a CL<sub>50</sub> do mesmo óleo foi de 251 mg L<sup>-1</sup> (251 ug mL<sup>-1</sup>), classificando-o como atóxico. Isso pode ser explicado devido às diferenças na composição dos integrantes ou diferenças na concentração do composto majoritário em diferentes plantas de uma mesma espécie, já que em outros estudos como de GOMES *et al.* (2019) e REIS (2012) classificaram o óleo de canela como moderadamente tóxico devido as CL<sub>50</sub> de ambos resultarem em 162,1 mg L<sup>-1</sup> (162,1 ug mL<sup>-1</sup>)

Portanto, além de menor toxicidade, óleo essencial de canela também possui uma maior atividade antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila*, explicando, assim, o motivo do óleo essencial de canela casca ser escolhido para ser usado nos testes *in vivo*, adicionando-o na ração de Tilápias-do-Nilo como um suplemento com o intuito de observar melhorias na saúde dos peixes.

### 3.2. ENSAIO ANTAGÔNICO COM PROBIÓTICOS

Todas as linhagens probióticas conseguiram crescer e se desenvolver bem no leite 10% após 48 horas da inoculação inicial, confirmando esse crescimento após a verificação da acidificação do meio junto com a visualização da coagulação do leite. Apenas quando o meio alcançou aproximadamente o pH 4,0 e a coagulação do leite que foi realizado os testes *in vitro*. Nos testes por difusão em ágar, a maioria das linhagens e os dois pools probióticos apresentaram efeito antagônico contra a bactéria *Aeromonas hydrophila* nos três diferentes tratamentos dos probióticos (**Figura 27**). Porém, duas linhagens isoladas (*Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus clausii*) não obtiveram uma média de inibição satisfatória em todos os tratamentos. O poder antagônico das cepas probióticas foi conferido através da formação das zonas de inibição, presentes na **Tabela 10**.



**Figura 27:** Visualização dos halos de inibição dos probióticos com as identificações já nomeadas na metodologia, onde cada número é uma linhagem em determinado tratamento.

**Tabela 10:** Média dos halos de inibição resultantes do antagonismo dos probióticos frente a *Aeromonas hydrophila*.

| PROBIÓTICOS           | MÉDIA DOS HALOS (mm) |               |                           |
|-----------------------|----------------------|---------------|---------------------------|
|                       | EM LEITE             | SOBRENADA NTE | SOBRENADA NTE CONCENTRADO |
| FLORA 5®              | 11,6 ± 0,57          | 11,6 ± 1,15   | 16 ± 1,0                  |
| TROPICAL PRO DEFENCE® | 11,0 ± 1,0           | 11,3 ± 1,52   | 13,6 ± 1,52               |
| <i>L. bulgaricus</i>  | 10,3 ± 0,57          | 10,6 ± 0,57   | 13,0 ± 1,0                |
| <i>B. bifidum</i>     | 0 ± 0                | 0 ± 0         | 6 ± 6,7                   |
| <i>L. fermentum</i>   | 11,3 ± 1,52          | 11,3 ± 1,52   | 13,0 ± 1,73               |
| <i>B. clausii</i>     | 0 ± 0                | 0 ± 0         | 0,33 ± 0,57               |

Os testes com o primeiro tratamento probiótico consistiram na verificação antagônica das linhagens e dos pools apenas crescidos em leite 10% por 48 horas. Das quatro linhagens isoladas, apenas duas cepas (*L. bulgaricus*, *L. fermentum*) conseguiram inibir o crescimento da bactéria patogênica e as outras linhagens isoladas (*Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus clausii*) não conseguiram inibir o crescimento bacteriano. Dentro dessas linhagens isoladas, a que apresentou maior poder antagônico foi a bactéria *L. fermentum*. Em relação aos dois pools (FLORA 5® e TROPICAL PRO DEFENSE ®), ambos conseguiram inibir o crescimento da *Aeromonas hydrophila*, na qual o pool FLORA 5® obteve maior ação inibitória, porém com pouca variação do diâmetro dos halos de inibição em comparação com o outro pool.

Já os testes com o segundo tratamento probiótico, primeiramente consistiu na centrifugação do crescimento bacteriano em leite 10% após 48 horas, utilizando o sobrenadante na verificação antagônica das linhagens contra a bactéria patogênica. Os resultados desta etapa não diferiram muito dos resultados com o primeiro tratamento em relação às médias dos halos de inibição. Como no primeiro tratamento, tanto as linhagens *Bifidobacterium bifidum* e *Bacillus clausii* não demostram ação antagônica e a cepa bacteriana isolada que apresentou maior poder antagônico também foi a *L. fermentum*. Outra semelhança com os testes do primeiro tratamento foi que o pool FLORA 5® conseguiu uma melhor inibição do patógeno em comparação com o pool TROPICAL PRO DEFENSE ®, confirmado por maiores medidas dos diâmetros dos halos de inibição.

Por fim, no terceiro tratamento probiótico, ao concentrar com gás nitrogênio o sobrenadante do crescimento bacteriano em leite 10%, o poder antagônico intensificou, fazendo com que todos os probióticos testados obtivessem atividades antagônicas contra a bactéria patogênica, porém em diferentes níveis de inibição, devido o ato de concentrar em nitrogênio garantir uma maior capacidade inibitória. As linhagens isoladas com menores níveis de inibição foram *Bifidobacterium bifidum* e *Bacillus clausii*, caracterizando esta última linhagem isolada como a com menor poder antagônico. Em relação aos resultados dos testes utilizando os concentrados dos pools bacterianos, o pool FLORA 5® continuou inibindo mais a bactéria patogênica do que o pool TROPICAL PRO DEFENSE ®.

Um trabalho semelhante foi realizado por BONIN *et al.* (2019), onde também verificou a atividade antagonista de diversas bactérias ácido lácticas (*Bacillus clausii*, *Bifidobacterium bifidus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*,

*Lactobacillus plantarum*) crescidas em leite 10%, centrifugadas e também concentradas com nitrogênio contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*. No trabalho citado, todas as linhagens bacterianas nos três tratamentos apresentaram alto poder antagônico contra o patógeno, o que difere deste presente trabalho devido à baixa atividade inibitória das linhagens *Bifidobacterium bifidus* e *Bacillus clausii*, demonstrando que há diferenças na atividade e crescimentos de cepas da mesma espécie. Os resultados de ambos os estudos se assemelham devido às linhagens *L. bulgaricus* e *L. fermentum* formarem zonas de inibição representativas pelo seu significativo poder antagonista. Outra semelhança, é que o poder antagônico das linhagens foi elevado após concentrar em nitrogênio as culturas probióticas, um possível motivo para isso é que após esse processo a concentração dos compostos ácidos gerados na fermentação dos nutrientes presentes no leite pelas bactérias ácido lácticas aumentou e são esses os componentes, suspeitos de provocarem as ações inibitórias.

O gênero *Lactobacillus* é um dos gêneros de bactérias ácido lácticas mais encontradas na microbiota intestinal dos animais e também em diversas fontes alimentícias, além de ser frequentemente estudado por ter todas as características ideais que um probiótico necessita, além de possuir ação inibitória contra alguns dos patógenos mais prejudiciais para saúde animal e saúde humana. Contudo, o grau de inibição dessas bactérias lácticas pode variar conforme a espécie, o patógeno a ser testado e também pode variar conforme as cepas utilizadas dentro de uma mesma espécie, mas mesmo assim, os *Lactobacillus* continuam sendo conhecidos nas pesquisas científicas como grandes detentores de atividades antagônicas. Esse poder antagônico pode ser observado neste estudo, já que a maioria das linhagens que apresentaram excelentes atividades inibitórias pertence ao gênero *Lactobacillus*. Diversas pesquisas já evidenciaram o importante papel inibitório desse gênero, uma delas foi realizado por DHANASEKARAN *et al.* (2009). Os autores preferiram analisar as linhagens de *Lactobacillus* provindo da própria microbiota natural dos peixes, conseguindo isolar 59 cepas de *Lactobacillus* de cinco peixes diferentes: *Clarias orientalis*, *Anguilla* sp, *Labeo rohita*, *Oreochromis* sp e *Puntius carnaticus* e dessas cepas apenas 3 linhagens apresentaram excelentes efeitos inibitórios contra a bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila*.

JAIN; MEHTA; BHARTI (2017) realizaram um estudo semelhante com o anterior citado, porém ao invés de isolar as linhagens do trato intestinal dos peixes, isolou de amostras de leite e esterco bovino. Dessa fonte conseguiu isolar 141 linhagens do gênero *Lactobacillus*, porém apenas 12 cepas apresentaram atividade antimicrobiana máxima para todos os patógenos escolhidos (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*,

*Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus*), na qual conseguiu identificar que as espécies *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermentum* eram as mais predominantes e que conseguiam inibir melhor os patógenos, se assemelhando em partes com esse presente trabalho, pois a espécie *Lactobacillus fermentum* foi uma das linhagens ácido lácticas que demonstrou excelente ação inibitória.

Outra pesquisa compatível com esta, não só utilizando bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*, isoladas de fontes lácteas, como também analisou e comparou as propriedades antimicrobianas de células probióticas inteiras com células livres sobrenadantes obtidas por centrifugação contra seis patógenos (*E. coli*, *Bacillus cerus*, *S. aureus*, *S. typhi*, *Aeromonas hydrophila* e *Klebsiella pneumonia*). Algumas das cepas indentificadas foram: *L. planterum*, *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. delbrucii lectis*. Como resultado, os produtos sobrenadantes das linhagens mostraram maior poder inibitório para todos os patógenos, exeto para *A. Hydrophila*, com especial destaque da cepa *L. fermentum*, com média de diâmetro dos halos inibitórios de 10 mm. Todas essas pesquisas apenas comprovam o que já foi dito anteriormente, a existência de oscilações no poder antagônico dos probióticos, principalmente quando linhagens da mesma espécie são isoladas de diferentes fontes.

Ao compilar os resultados dos três tratamentos probióticos, pode-se constatar que o probiótico com um maior potencial antagônico foi FLORA 5®, motivo pelo qual foi escolhido para ser usado nos testes *In vitro*, suplementando na ração dos peixes. Sua maior eficiência ao inibir esta relacionada com sua composição, na qual um pool de linhagens probióticas pode ser mais eficiente na inibição do que linhagens isoladas.

Essa colocação também tem fundamento nos estudos de PANNU *et al.* (2013) que observou maiores valores das zonas de inibição contra *A. hydrophila* (1,967mm), *Enterobacter aerogenes* (1,927mm), *Klebsella pseudomoniae* (2,033 mm), *Pseudomonas fluorescens* (2,433mm), *Salmonella* spp (1,667) e *Shigella* spp (1,867mm), produzidos por um probiótico comercial com linhagens misturadas (pool bacteriano: Aquapro<sup>TM</sup>) em comparação com uma cepa ácido láctica (*L. sporogenes*). De acordo com esses autores, a vantagem de utilizar preparações com múltiplas cepas é pela presença de uma maior sensibilidade aos patógenos, além de serem ativas contra diversas doenças e usadas em diversos animais na aquicultura. As composições microbianas das preparações múltiplas probióticas podem ser diversas, utilizando não apenas bactérias como também fungos com função probiótica que podem apresentar efeitos antimicrobianos. SHARMA (2016) utilizou sua dissertação para provar que essa mistura de diferentes microrganismos também pode desempenhar um excelente papel antagônico contra a bactéria *A. hydrophila* ao formular dois pools. O primeiro

pool foi composto de: *Nitrosomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Nitrobacter*, *Trichoderma* e *Bacillus megetherium*. E o segundo pool foi formulado com os seguintes microrganismos: *Lactobacillus sporogenes*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Saccharomyces cervirial*. Ambos os probióticos formulados apresentaram atividade inibitória contra o patógeno, contudo foi o segundo pool que se mostrou com maior poder antagônico do que o primeiro pool, provavelmente por ser composto majoritariamente por bactérias ácido-láticas, que produzem bacteriocinas, ácido lático, entre outros compostos com capacidade de inibir ou matar os patógenos.

FLORA 5® é um dos diversos produtos probióticos disponíveis no mercado, por ser destinado ao uso humano existe diversas dúvidas e receios sobre sua aplicação em outros seres vivos. Muitos desses produtos podem ser considerados ineficazes, já que são isolados de outros animais ou alimentos, sendo preferível o uso de microrganismos que já pertencem naturalmente na microbiota dos peixes, com um pretexto de trazer mais equilíbrio à flora bacteriana dos animais. Por isso que muitos estudos têm como objetivo isolar e identificar bactérias autóctones, ou seja, bactérias naturais da microbiota dos peixes com ação probiótica (CHOSH *et al.*, 2007). Como é o caso da pesquisa feita por KOTZENT (2017), que caracterizou bactérias extraídas do intestino de Tambaquis, identificando-as das espécies: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus saprophyticus* e posteriormente analisou a ação inibitória delas contra o patógeno *Aeromonas hydrophila*, na qual os valores em mm das zonas de inibição variaram entre 4 à 6 mm. Outros diversos autores também objetivaram a seleção e o isolamento bactérias autóctones do trato intestinal, conseguindo identificar bactérias ácido-láticas principalmente do gênero *Lactobacillus*, gênero mais avaliado nesta pesquisa. Um desses trabalhos foi de SPECK (2010), que isolou do trato intestinal de jundiás e tilápia-do-nilo bactérias ácido láticas de espécies: *Leuconostoc lactis* e *Lactobacillus plantarum*, através desse isolamento realizou ensaios antagonistas contra o mesmo patógeno *A. hydrophila*, obtendo zonas de inibição, em ambas as bactérias probióticas, de 8mm.

Nota-se que nos trabalhos citados, o poder antagônicos das linhagens bactérias autóctones foi menor do que as linhagens bacterianas comerciais, visualizado nesse presente trabalho. Levando em conta que um elevado poder antimicrobiano é um dos importantes critérios para escolher qual probiótico deve ser utilizado na criação de peixes, fica a incerteza de qual linha de probióticos deve ser julgada a mais apta para ser usada como suplemento na piscicultura: os probióticos isolados de outras fontes (cepas alóctones) ou probióticos isolados da microbiota natural dos peixes (autóctone). Foi por isso que dentre os produtos probióticos

testados, analisou o poder inibitório do produto comercial TROPICAL PRO DEFENCE ® composto por linhagens bactérias isoladas dos peixes e também comparou sua ação inibitória com a ação inibitória do produto FLORA 5®, direcionado para uso humano. E de acordo com os resultados dos testes *in vitro*, o produto FLORA 5® conseguiu inibir melhor a bactéria patogênica de peixes em comparação ao produto TROPICAL PRO DEFENCE ®, este destinado ao uso em peixes de aquários, sendo um passo importante para demonstrar os benefícios desses produtos para uso humano na saúde dos peixes.

Se todas as pesquisas com a finalidade de testar a ação inibitória das linhagens autóctones tivessem um resultado antagonico inferior das pesquisas com linhagens alóctones, a incerteza estaria mais próxima de ser solucionada. Porém, o trabalho de SOUZA *et al.* (2019) redirecionou essa análise ao isolar 31 cepas bactérias do intestino de tambaquis, destas, 8 cepas ácido lácticas demonstraram resultados inibitórios positivos contra *A. hydrophilas*, com maiores valores dos halos de inibição em mm no intervalo de 17,1 a 20,4 mm, que mais adiante foram identificadas suas espécies: *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecalis*.

Os resultados da pesquisa de JATOBÁ *et al.* (2008) também sinalizou uma maior ação antagonica das cepas autóctones isoladas do intestino de Tilápias-do-Nilo do que a ação antagonica verificada no estudo presente, porém utilizando outros patógenos como: *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *Enterococcus durans*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*, também causadores de grande impactos na piscicultura e causadores de preocupações com a saúde pública, tendo como desfecho a seleção de seis cepas isoladas, ácido lácticas, com duas dessas cepas com maiores halos de inibição (15,7mm), identificadas como *L. platarum* e *L. brevis*. Todos esses dados revelam que eleger um microrganismo para o papel de probiótico não depende apenas do grau do seu poder antagonico, como também dependem de outros diversos critérios como uma permanência prolongada no trato gastrointestinal, resistência as enzimas digestivas e ao pH ácido estomacal e um outro critério de suma importância é garantir a segurança dos hospedeiros, ou seja, não ter a capacidade de causar prejuízos e doenças nos peixes (RAMESH *et al.*, 2015).

A microbiota natural dos peixes é composta por inúmeras bactérias, que quando o hospedeiro está saudável se encontra equilibrada. Contudo, de acordo com FLORES-MIRELES *et al.* (2015), alguns desses microrganismos podem ser considerados maléficos para a saúde dos peixes em situações de desequilíbrio da flora, causando assim doenças infecciosas. Esse fato tem por finalidade questionar se todas as novas linhagens bacterianas autóctones isoladas da microbiota intestinal dos peixes, que apresentaram ação antagonica

comprovada, não arriscariam futuramente a segurança dos peixes em todos os momentos de seu desenvolvimento, tornando-se necessários muito mais estudos sobre sua segurança animal. Na qual esta segurança encontra-se mais encaminhada ao se tratar de produtos probióticos isolados de outras fontes (alóctones) já presentes no mercado para o consumo humano, já que para estes produtos entrarem no mercado precisam passar por diversos testes de segurança.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO 1

Em relação aos resultados dos testes com óleos essenciais, o óleo de canela casca apresentou-se com maior poder inibitório do que os óleos de coentro erva e hortelã-pimenta, encontrando durante a discussão, tanto pesquisas que corroboram estes resultados como pesquisas que apresentaram resultados diferentes e/ou contrários. Em resumo, essa variação nos resultados inibitórios dos óleos essenciais pode ser interligado diretamente com as diferenças nas concentrações dos compostos ativos de uma mesma espécie de planta, nas diferentes dosagens dos óleos utilizadas e na metodologia na qual os óleos essenciais foram extraídos. Em relação aos ensaios ecotoxicológicos, apesar de apresentarem um nível de toxicidade, os óleos essenciais em comparação com antibióticos amplamente utilizados, demonstram um risco bem pouco potencializado, porém há a necessidade de pesquisar mais sobre seus efeitos toxicológicos em um ambiente natural, ou seja, em um ambiente interposto por diversas condições naturais.

Já ao se tratar dos probióticos testados contra a bactéria patogênica, o pool bacteriano Flora5 demonstrou ser mais eficaz na inibição do patógeno, o que pode estar relacionado tanto com a composição da mistura probiótica quanto com a interação positiva entre as linhagens constituintes deste produto. Apesar de ser questionada a eficácia do uso de produtos próbióticos com origem alóctone, como o Flora5, por não fazerem parte da microbiota natural dos peixes e assim não desempenhar maiores benefícios e maior segurança a saúde dos peixes em comparação aos probióticos com linhagens autóctones, ou seja, extraídas da própria espécie de peixe a ser alimentado, tanto o Flora 5 como outros produtos probióticos alóctones utilizados nas pesquisas citadas na discussão acima, apresentaram um ótimo desempenho inibitório contra bactérias patogênicas em peixes. Portanto, diante dos resultados positivos do Flora5 nos ensaios *in vitro*, o uso de probióticos alóctones como suplementos alimentares na piscicultura deveria ser considerado com um opção relevante, sempre realizando mais estudos para confirmar seus benefícios para a saúde e desempenho

dos peixes.

Por fim, foram selecionados o óleos de canela casca e probiótico Flora 5 para compor os tratamentos alimentares das tilápias-do-nilo nos testes *in vivo*.

## **CAPÍTULO 2**

**ENSAIO *IN VIVO***

---

---

## 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

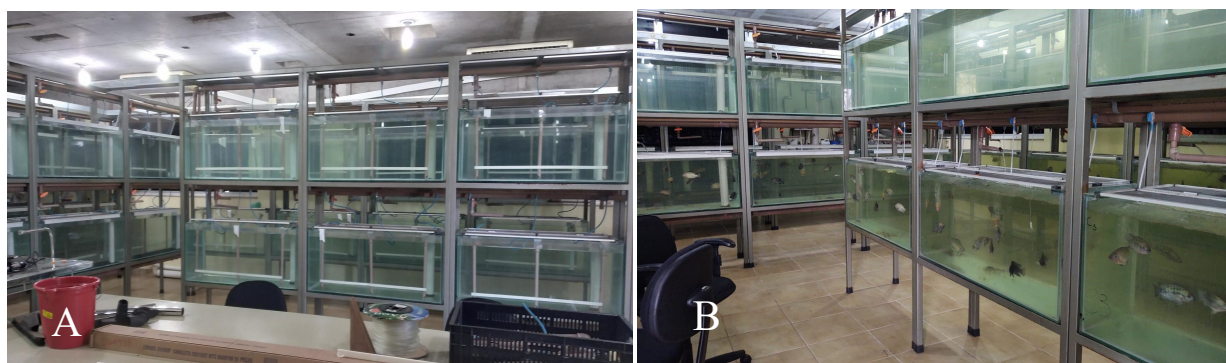
- Avaliar a utilização do probiótico FLORA 5® e do óleo essencial de Canela casca como suplemento alimentar para tilápias-do-nilo
- Verificar a influência do uso do probiótico e do óleo essencial sobre o desempenho, mortalidade, perfil hematológico e na qualidade da água antes e depois da infecção experimental com *Aeromonas hydrophila*

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os testes *in vivo* ocorreram no laboratório de ecossistemas aquáticos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Meio Ambiente).

### 2.1. AQUISIÇÃO DOS ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO

Foram utilizados peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-Nilo) adquiridos de piscicultor registrado e cadastrado na CEUA da Embrapa Meio Ambiente. Antes de iniciar o experimento, os 120 peixes foram mantidos em dois tanques de 2000L com renovações de água e aerações constantes por um período de sete dias para o cumprimento da quarentena, fornecendo ração duas vezes ao dia até completa saciedade. Após o período de quarentena, realizou-se a distribuição de 120 peixes em 12 aquários retangulares de vidro com volume útil de 2000L (10 peixes por aquário), suplementados com aeração constante abastecida por meio de um compressor de ar radial 1,0 cv/ sistema (**Figura 28**).



**Figura 28:** Distribuição dos peixes nos aquários. **A:** Sistema de aquários antes da distribuição dos peixes. **B:** Sistema de aquários com os peixes já inseridos e distribuídos.

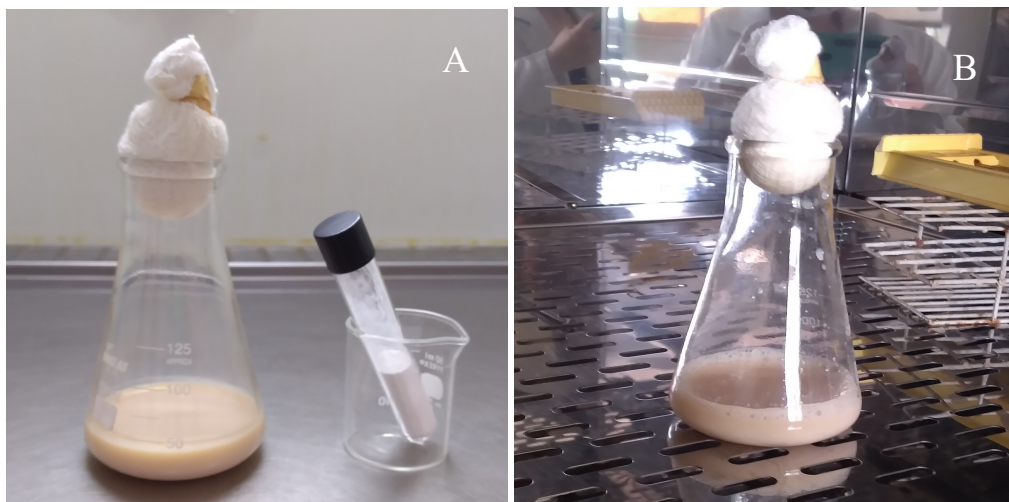
## 2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos (controle, T1 e T2) e quatro repetições. No tratamento controle os peixes foram alimentados com ração comercial sem nenhum aditivo. No T1, adicionaram-se probiótico na ração dos peixes e na alimentação dos peixes da T2 foi incorporado o óleo essencial na ração. Tanto o óleo essencial quanto os probióticos utilizados já passaram pela seleção da melhor fonte e melhor linhagem a ser misturado na ração. A suplementação alimentar durou 35 dias, após esse tempo, todos os peixes de todos os tratamentos foram expostos ao patógeno *Aeromonas hydrophila*. Após esse período foram realizadas três coletas: coleta 0 (após a suplementação), coleta 1 (após 24 horas da infecção pelo patógeno) e coleta 2 (após 48 horas da infecção pelo patógeno), sempre anestesiando os peixes com benzocaína (100 mg/L) em cada coleta.

### 2.2.1. PREPARO E INCORPORAÇÃO NA RAÇÃO

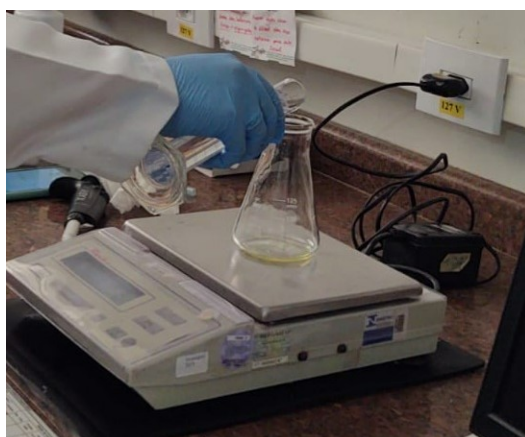
As rações com % de PB (Proteína Bruta) foram pesadas e preparadas semanalmente na proporção de 3% do peso vivo/dia, totalizando cerca de 403,2 gramas de ração, quantidade exata para alimentar duas vezes ao dia as quatro repetições (quatro aquários) do tratamento com 12 peixes cada por 7 dias.

No preparo da ração do Tratamento 1 (com probiótico), após o crescimento das linhagens probióticas no meio de leite 10% em estufa por 48 horas (**FIGURA 29**), o probiótico Flora 5® foi incluído na ração, na proporção de 100 mL de leite por quilograma de ração comercial, com concentração de  $10^9$  UFC de cepas, resultando em 3,63 gramas de probiótico crescido em 40,32 gramas de leite 10% no preparo semanal, de acordo com o método de JATOBÁ *et al.* (2008).



**Figura 29:** Preparo do probiótico Flora 5®. **A:** Ativação do probiótico na forma de pó em leite 10%. **B:** Crescimento do probiótico ativo em leite na estufa à 35°C por 48 horas

Já no preparo da ração do Tratamento 2 (com óleo de canela) foi seguido a proporção, de acordo com DAIRIKI *et al.*(2013), de 1,5 gramas de óleo de canela casca diluído em 100 mL de álcool de cereais por quilograma de ração, na qual resultou na dissolução de 0,6 gramas de óleo de canela em 40,32 mL de álcool de cereais no preparo semanal (**Figura30**).



**Figura 30:** Diluição do óleo de canela em álcool de cereais

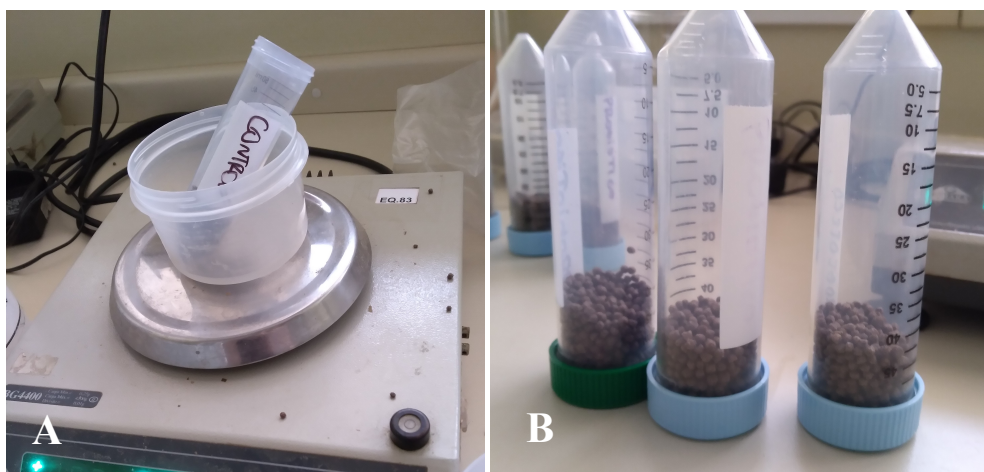
Tanto a incorporação do óleo de canela quanto do probiótico na ração foram realizadas pelo método de aspersão (**Figura 31**). Após a aspersão do probiótico, a ração permaneceu em estufa 35°C por 24 horas para a secagem da ração, armazenando em refrigerador a 4°C durante o experimento. Já a ração aspergida com óleo de canela foi secada

em temperatura ambiente por 24 horas. Ambas as rações foram armazenadas em refrigerador na temperatura de 4°C durante a semana.



**Figura 31:** Preparo semanal da ração. **A:** Utilização de pulverizador manual para o preparo das rações dos tratamentos com probiótico e óleo de canela. **B:** Pulverização manual da ração

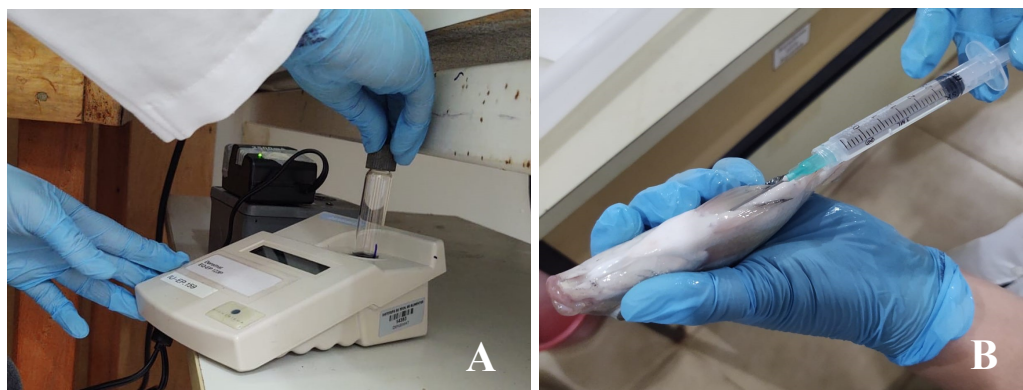
Após a aspersão e secagem dos aditivos, as rações foram armazenadas em tubos Falcon, dividindo a quantidade da ração semanalmente em 2 tubos Falcon com 7,2 gramas de ração para cada aquário por dia, já que as rações foram servidas duas vezes ao dia para os peixes (**Figura 32**).



**Figura 32:** Separação da ração em porções diárias. **A:** Pesagem da quantidade diária da ração em uma balança analítica. **B:** Rações já separadas em tubos Falcon na proporção de duas unidades por aquário em um dia.

### 2.2.2. INFECÇÃO PELO PATÓGENO

Os peixes foram expostos ao patógeno *Aeromonas hydrophila*, já crescido em meio de cultura apropriado, por meio de injeção intraperitonal nos três tratamentos, na concentração de  $10^7$  UFC do patógeno, obtida com auxílio do aparelho Densimat, em 1 mL de solução salina para cada peixe, após 35 dias de suplementação alimentar (**Figura 33**).



**Figura 33:** Infecção experimental dos peixes por *Aeromonas hydrophila*. **A:** Determinação da concentração do patógeno ( $10^7$  UFC) a ser inoculado no peixe através do aparelho Densimat. **B:** Inoculação do patógeno por meio de injeção intraperitonal.

### 2.2.3. BIOMETRIA

Medições do comprimento e do peso dos peixes foram realizados em quatro momentos diferentes: antes de começar os tratamentos e na realização das três coletas, anestesiando-os antes com benzocaína (100 mg/L).

Para verificar se houve crescimento e ganho de peso, foi necessário realizar os cálculos do peso médio (PM), Biomassa (BM), ganho de peso (GP) e crescimento total (CT)

$$\text{PM : } \frac{\text{PESO AMOSTRADO}}{\text{Nº PEIXES AMOSTRADOS}}$$

demonstrados abaixo:

$$\text{BM : PESO MÉDIO } \times \text{ N° DE PEIXES NO VIVEIRO}$$

$$\text{GP : BM ATUAL } - \text{ BM ANTERIOR}$$

$$\text{CT : CRESCIMENTO ATUAL } - \text{ CRESCIMENTO ANTERIOR}$$

Além disso, também foi calculado a Taxa de Conversão Alimentar (TCA) para cada tratamento, na qual mede o aproveitamento da ração pelos peixes.

$$\text{TCA} : \frac{\text{QUANTIDADE DE RAÇÃO FORNECIDA}}{\text{GANHO DE PESO TOTAL DOS PEIXES}}$$

#### 2.2.4. AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS PEIXES

Para cada coleta, três peixes de cada tratamento foram anestesiados com benzocaína (100 mg/L), analisados quanto a letalidade e os sintomas clínicos característicos de bacterioses nos peixes e eutanasiados por aprofundamento anestésico para serem necropsiados.

#### 2.2.5. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Após a indução anestésica com benzocaína 100 mgL<sup>-1</sup>, foi realizado as coletas de sangue, em torno de 1,5mL de sangue, por punção venocaudal com seringas contendo EDTA (3%). Em cada coleta foram utilizados para essa etapa, três peixes de cada repetição por tratamento. Extensões sanguíneas tiveram finalidade de determinar o número de leucócitos totais (LØ; x10<sup>-3</sup>.µL<sup>-1</sup>), trombócitos (Trb; x10<sup>-3</sup>.µL<sup>-1</sup>), corando pelo método do panótico rápido e em seguida analisadas em microscópico óptico comum.

Análises de eritrócitos (Eri; x10<sup>-6</sup>.µL<sup>-1</sup>) e de hemoglobina (Hb; g.dL<sup>-1</sup>) foram realizados, pelo método modificado de Oliveira *et al.* (2008) e pelo método do cianeto de hemoglobina (HiCN) com o kit da Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, respectivamente. Após as análises, realizou-se a contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer, utilizando microscópico óptico comum na objetiva de 40 vezes (**Figura 34**) e o hematócrito (Htc; %) foi determinado pelo método do microhematócrito.



**Figura 34:** Contagem de eritrócitos em Câmara de Neubauer na objetiva de 40X em um microscópio óptico comum

Foram calculados os índices hematimétricos de Volume Corpuscular Médio (VCM; fL) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular média (CHCM; %) através das seguintes fórmulas:

$$\text{VCM : } \frac{\text{HEMATÓCRITO} \times 10}{\text{Nº ERITRÓCITOS}}$$

$$\text{CHCM : } \frac{\text{TAXA DE HEMOGLOBINA} \times 100}{\text{HEMATÓCRITO}}$$

#### 2.2.6. MONITORAMENTO FÍSICO-QUÍMICO DA ÁGUA

Os dados como temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ), condutividade ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ) e turbidez (NTU) foram medidos diariamente, do dia 30 de agosto ao dia 29 de setembro, usando uma sonda multiparâmetro (U-50, Horiba, Minami-ku, Kyoto, Japan). E os níveis de amônia foram medidos através de kits colorimétricos (Hach, Loveland, CO, USA).

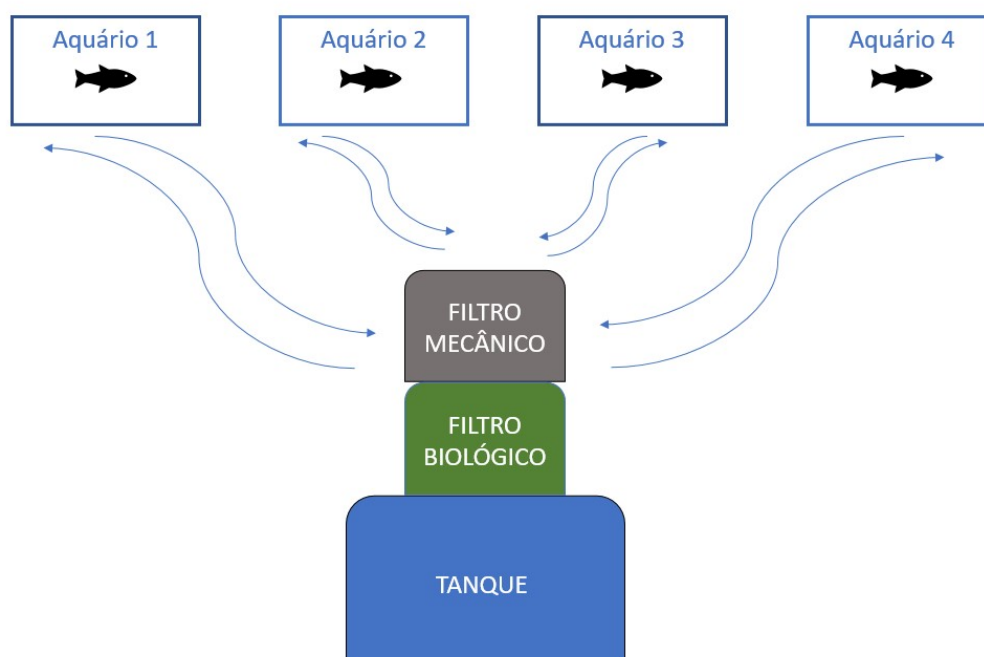
#### 2.2.7. MODELO ESTATÍSTICO

Todos os resultados obtidos nos testes *in vivo* foram analisadas pelo programa R pelo Modelo de Regressão Linear Múltipla Multivariada com 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. MONITORAMENTO FÍSICO-QUÍMICO DA ÁGUA

Foi utilizado neste experimento o sistema de recirculação da água, onde a água foi recirculada dos aquários para tanques de água, onde a água de cada tratamento desembocava em um tanque diferente e assim, não ocorrendo a mistura de água dos três tratamentos. Antes de chegarem aos tanques, a água passava por um sistema de filtragem: mecânica e biológica. Esse sistema pode ser melhor compreendido no esquema e na foto a seguirem (**Figura 35; Figura 36**).



**Figura 35:** Esquema do Sistema de recirculação da água utilizado neste experimento



**Figura 36:** Sistema de recirculação da água

Os sistemas de recirculação de água já são muito utilizados em laboratórios de pesquisa e na manutenção de peixes ornamentais, porém seu uso em criações super intensivas iniciou-se a pouco tempo, trazendo vantagens desse sistema por terem tamanho compacto, por diminuir o consumo de água, sendo ideal para produtores que não possuem recursos hídricos de fácil acesso, além da possibilidade de conseguir controlar de forma mais precisa os parâmetros ambientais e assim conquistar uma produção contínua e mais rentável, gerando menos impactos ambientais (BRAZ FILHO, 2000). Esse controle mais absoluto do ambiente está relacionado com maior controle da qualidade da água, na eliminação mais eficiente de resíduos orgânicos, na redução da proliferação de algas e fungos que trazem sabor desagradável à carne, trazendo vantagens econômicas para os piscicultores, além de vantagens para os consumidores, como uma melhor qualidade alimentar (RINGO et al., 2010).

Em relação aos parâmetros da qualidade da água, estes foram mensurados diariamente por 30 dias, os valores obtidos estão contidos na **Tabela 11**.

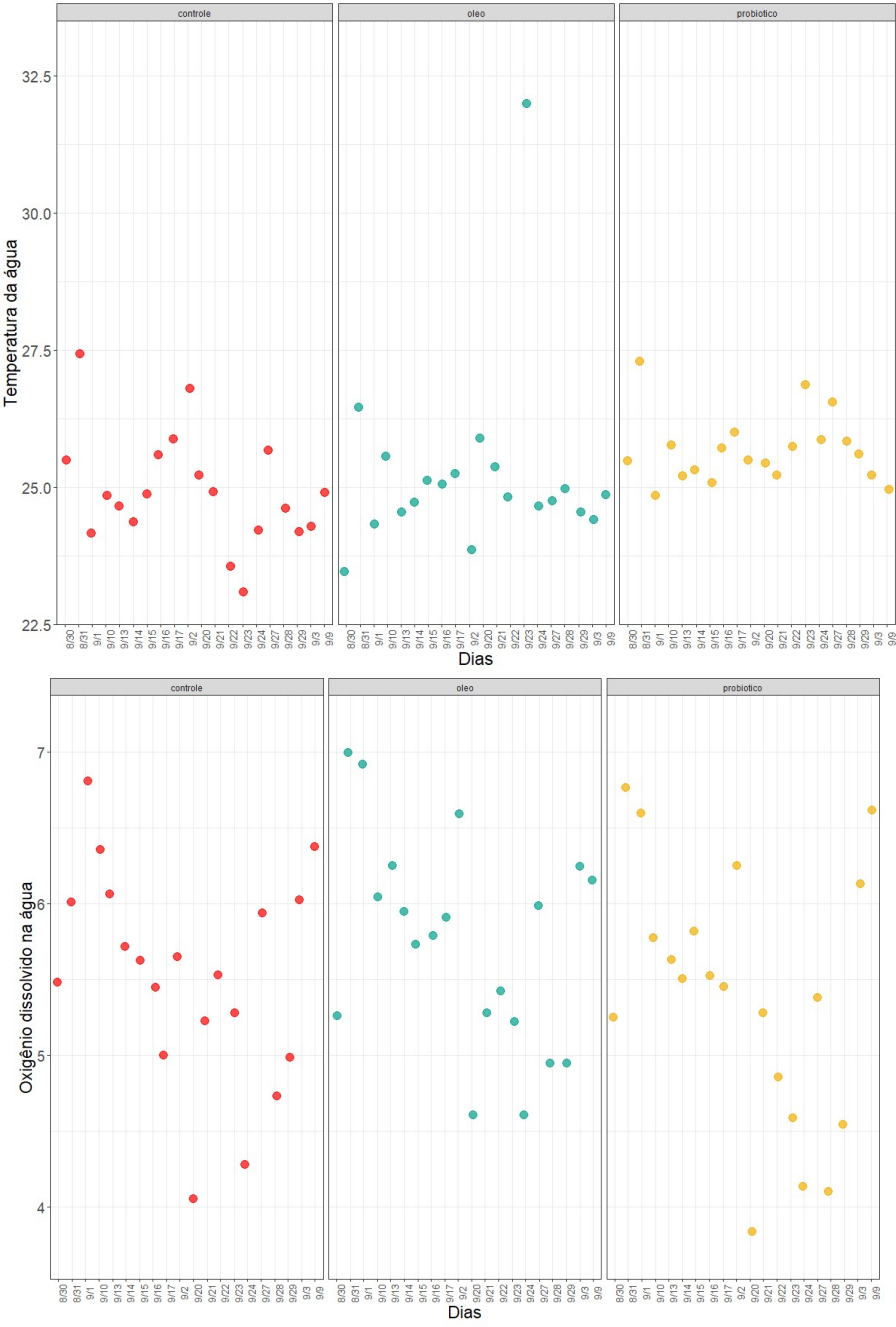
**Tabela 11:** Parâmetros Físico-Químicos da água durante 30 dias

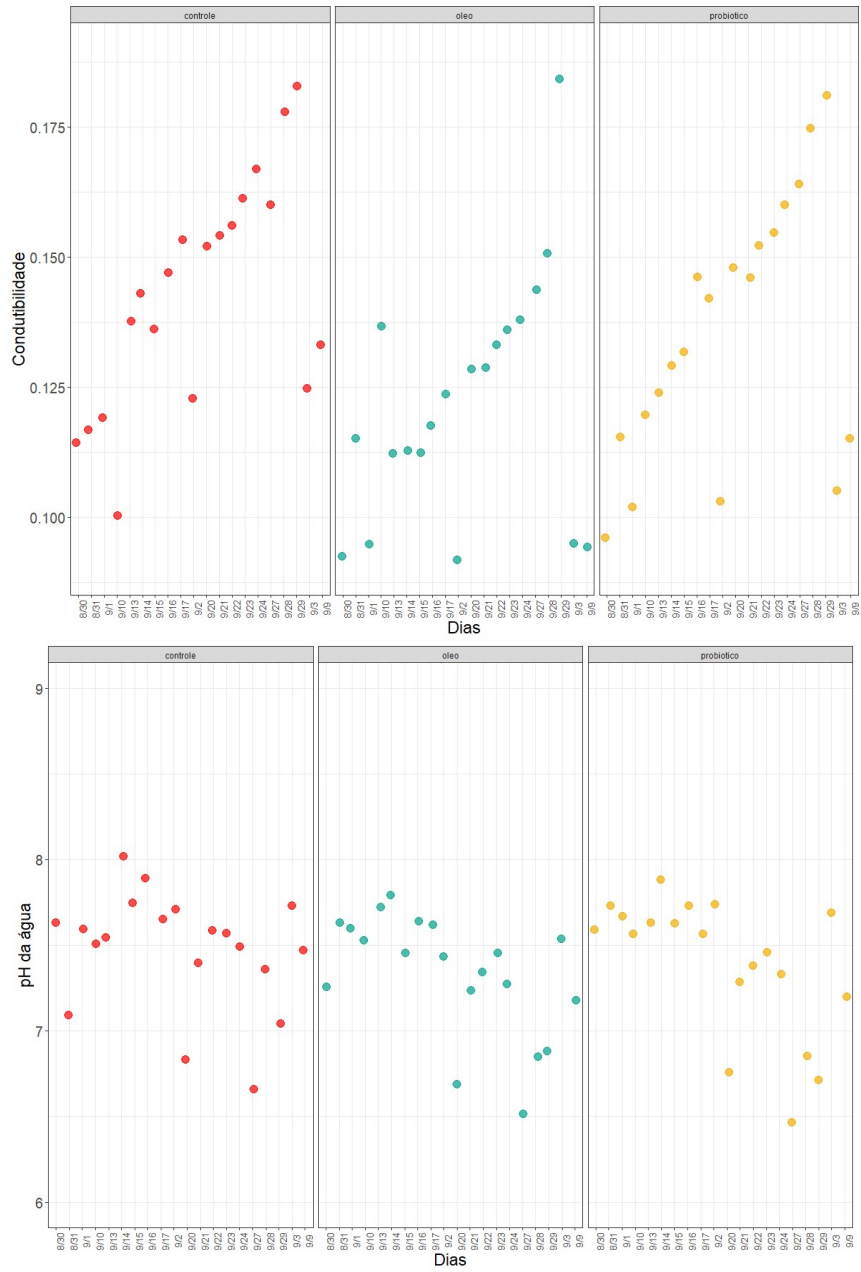
| Parâmetros Físico-Químicos |                           |                          |                          |                          |                          |                          |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Tratamentos                | Temp. (°C)                | pH                       | O.D. (mg/L)              | Cond. (µS/cm)            | Amônia                   | Turb. (NTU)              |
| Controle                   | 24,94 ± 1,02 <sup>a</sup> | 7,48 ± 0,34 <sup>a</sup> | 5,53 ± 0,69 <sup>a</sup> | 0,14 ± 0,02 <sup>a</sup> | 0,41 ± 0,31 <sup>a</sup> | 0,54 ± 0,62 <sup>a</sup> |
| Probiótico                 | 25,58 ± 0,63 <sup>a</sup> | 7,39 ± 0,40 <sup>a</sup> | 5,40 ± 0,85 <sup>a</sup> | 0,14 ± 0,03 <sup>a</sup> | 0,39 ± 0,29 <sup>a</sup> | 1,25 ± 1,34 <sup>b</sup> |
| Óleo Canela                | 25,23 ± 1,72 <sup>a</sup> | 7,33 ± 0,35 <sup>a</sup> | 5,74 ± 0,70 <sup>a</sup> | 0,12 ± 0,02 <sup>a</sup> | 0,38 ± 0,28 <sup>a</sup> | 0,70 ± 0,89 <sup>a</sup> |

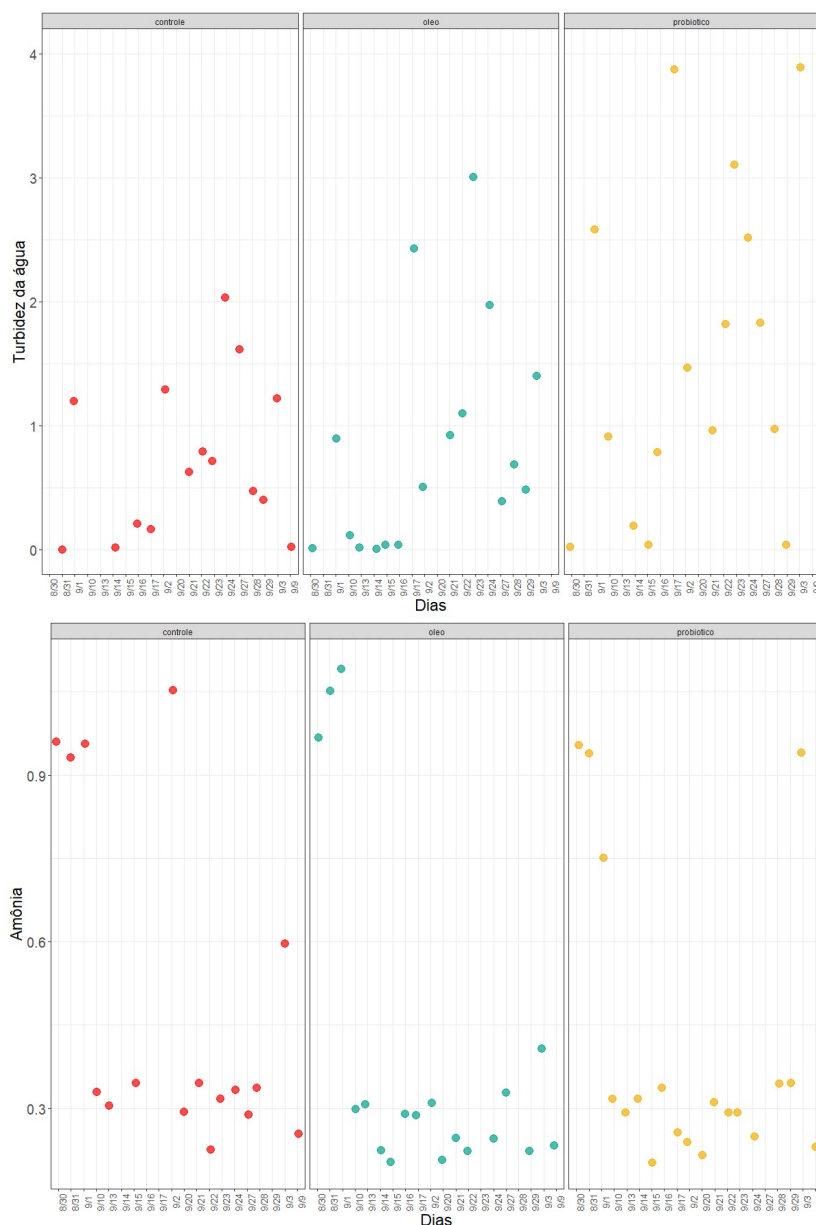
Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). Temp= Temperatura.

pH: Potencial Hidrogenionico. O.D.= Oxigênio Dissolvido. Turb.= Turbidez.

Para variações relacionadas aos tratamentos em 35 dias, a turbidez apresentou alterações nos tratamentos com óleo de canela (p<0,01) e probiótico (p=0,02) em comparação ao controle, esse fato pode estar correlacionado com a percepção de escurecimento da água nos aquários, de forma mais acentuada nos aquários do tratamento com probiótico. O pH foi o único parâmetro da qualidade da água que não apresentou modificações entre os tratamentos, nem ao longo do tempo. Os gráficos contidos na **Figura 37** ilustram melhor essas variações.







**Figura 37:** Gráficos de dispersão representando os parâmetros físico-químicos da água: temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg/L), condutibilidade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), amônia e turbidez (NTU) nos três tratamentos (Controle, Óleo Canela e Probiótico) durante os 30 dias mensurados.

Esses parâmetros físico-químicos da água obtidos neste experimento foram comparados com os valores de referência recomendados pelo CONAMA, Resolução No. 357/2005 para água de classe 2 (psicultura) (Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005) contidos na **Tabela 12** a seguir.

**Tabela 12:** Limites estabelecidos para a qualidade da água pelo CONAMA, Resolução No. 357/2005

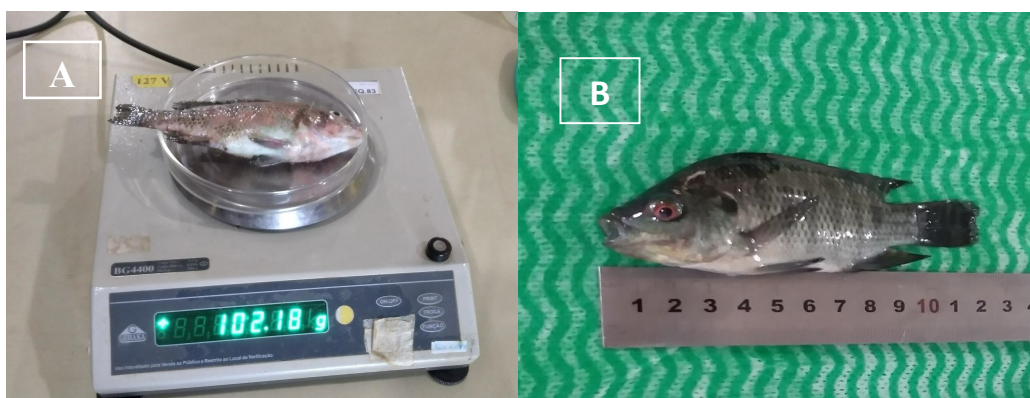
| PARÂMETROS                     | VALORES DE REFERÊNCIA |
|--------------------------------|-----------------------|
| Temperatura (C°)               | 28-32                 |
| Ph                             | 6,5-8,0               |
| Oxigênio Dissolvido (mg/L)     | 5-15                  |
| Turbidez (NTU)                 | ≤100                  |
| Condutividade elétrica (μS/cm) | < 1000                |
| Amônia não ionizada (mg/L)     | < 0,1                 |

Fonte: Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005.

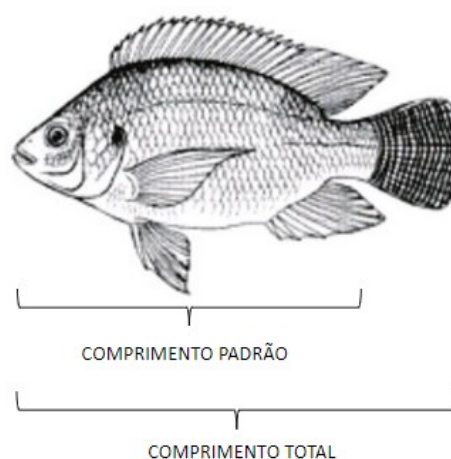
Os valores de referências acima se referem a criação de peixes de interesse comercial em águas doce em tanques e sistemas maiores de produção, por isso que alguns parâmetros da qualidade de água podem estar distintos dos limites recomendados, porém bem próximos. Apesar da temperatura se apresentar abaixo do limite de 28 °C pelo CONAMA, de acordo com SEGOVIA (2000), as tilápias apresentam certa resistência a diferentes amplitudes de temperatura, podendo sobreviver em temperaturas de 18 a 20°C. Em relação a amônia ionizada, ainda que na tabela mencione um limite superior de 0,1 mg/L, para tilápias valores abaixo de 2 mg/L trazem uma margem de segurança e bom crescimento para essa espécie (VINATEA, 2004). Os valores de amônia que foram expressos nesta pesquisa indicam que estão dentro da faixa de segurança para a sobrevivência dos animais. Ao levar em conta os outros parâmetros (pH, turbidez, condutividade e oxigênio dissolvido), todos se encaixam dentro dos valores de referência, constatando que este sistema empregado foi capaz de proporcionar sobrevivência e segurança para os peixes, na qual os cuidados diários com a qualidade da água são primordiais para o sucesso na criação de peixes (LAZZARI, 2008).

### 3.2. CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DOS PEIXES

Biometrias foram realizadas em quatro momentos diferentes: antes do início do experimento (Dia 26/setembro), 35 dias após a suplementação com aditivos (05/outubro), 24 horas após a infecção pelo patógeno (07/outubro) e 48 horas após a infecção (08/outubro). Durante as biometrias foi realizado a medição do peso (g) do peixe com auxílio de uma balança analítica e a medição do comprimento (**Figura 38**), tanto o comprimento padrão (CP: cm) quanto o comprimento total (CT: cm) (**Figura 39**). Os resultados da biometria estão expressos na **Tabela 13 e Tabela 14**.



**Figura 38:** Realização da biometria nas Tilápias-do-Nilo. **A:** medição do peso. **B:** medição do comprimento



**Figura 39:** Diferenciação visual do comprimento padrão e comprimento total

**Tabela 13:** Peso (g) medido nas quatro biometrias

| Tratamentos | Peso (g)                 |                           |                           |                           |
|-------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|             | 26/setembro              | 05/Outubro                | 07/Outubro                | 08/Outubro                |
| Controle    | 33,07± 0,77 <sup>a</sup> | 88,26± 15,41 <sup>a</sup> | 84,07± 11,32 <sup>a</sup> | 82,61± 10,04 <sup>a</sup> |
| Probiótico  | 31,8± 0,45 <sup>a</sup>  | 82,50± 5,80 <sup>a</sup>  | 80,11± 10,84 <sup>a</sup> | 83,80± 15,17 <sup>a</sup> |
| Óleo Canela | 34,09± 0,16 <sup>a</sup> | 87,45± 4,56 <sup>a</sup>  | 71,97± 6,34 <sup>a</sup>  | 83,87± 4,53 <sup>a</sup>  |

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ )

**Tabela 14:** Comprimento Total e Comprimento Padrão medido nas quatro biometrias

| Comprimento (cm) |                            |                            |                            |                             |                             |                            |                            |                            |
|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Tratamento       | 26/setembro                |                            | 05/Outubro                 |                             | 07/Outubro                  |                            | 08/Outubro                 |                            |
|                  | Pad                        | Total                      | Pad                        | Total                       | Pad                         | Total                      | Pad                        | Total                      |
| Controle         | 10,29<br>±0,2 <sup>a</sup> | 12,67<br>±0,1 <sup>a</sup> | 13,79<br>±1,2 <sup>a</sup> | 16,72±<br>1,4 <sup>a</sup>  | 13,93±<br>0,9 <sup>a</sup>  | 17,08<br>±1,2 <sup>a</sup> | 13,9±<br>0,76 <sup>a</sup> | 16,65<br>±0,9 <sup>a</sup> |
| Probiótico       | 10,25<br>±0,2 <sup>a</sup> | 12,55<br>±0,1 <sup>a</sup> | 13,48<br>±1,1 <sup>a</sup> | 16,53±<br>1,4 <sup>a</sup>  | 13,51±<br>1,22 <sup>a</sup> | 16,53<br>±1,5 <sup>a</sup> | 13,9±<br>1,05 <sup>a</sup> | 16,64<br>±1,3 <sup>a</sup> |
| Óleo             | 10,25<br>±0,1 <sup>a</sup> | 12,64<br>±0,1 <sup>a</sup> | 13,91<br>±0,9 <sup>a</sup> | 16,86±<br>1,09 <sup>a</sup> | 12,8±1,<br>28 <sup>a</sup>  | 15,75<br>±1,5 <sup>a</sup> | 13,43<br>±0,8 <sup>a</sup> | 16,28<br>±1,2 <sup>a</sup> |

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

Com base no peso e no número de peixes por tratamento foi possível calcular a biomassa dos peixes, contido na **Tabela 15**.

**Tabela 15:** Valores da biomassa (g) para cada biometria realizada

| Biomassa(g) |                          |                             |                            |                            |
|-------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Tratamentos | 26/setembro              | 05/Outubro                  | 07/Outubro                 | 08/Outubro                 |
| Controle    | 396,72±9,69 <sup>a</sup> | 1059,12±184,96 <sup>a</sup> | 1008,84±135,8 <sup>a</sup> | 991,32±120,45 <sup>a</sup> |
| Probiótico  | 381,6±13,20 <sup>a</sup> | 990±69,55 <sup>a</sup>      | 961,32±130,14 <sup>a</sup> | 1005,6±182,04 <sup>a</sup> |
| Óleo Canela | 408,96±3,43 <sup>a</sup> | 1049,4±54,78 <sup>a</sup>   | 863,64±76,09 <sup>a</sup>  | 1006,44±54,40 <sup>a</sup> |

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

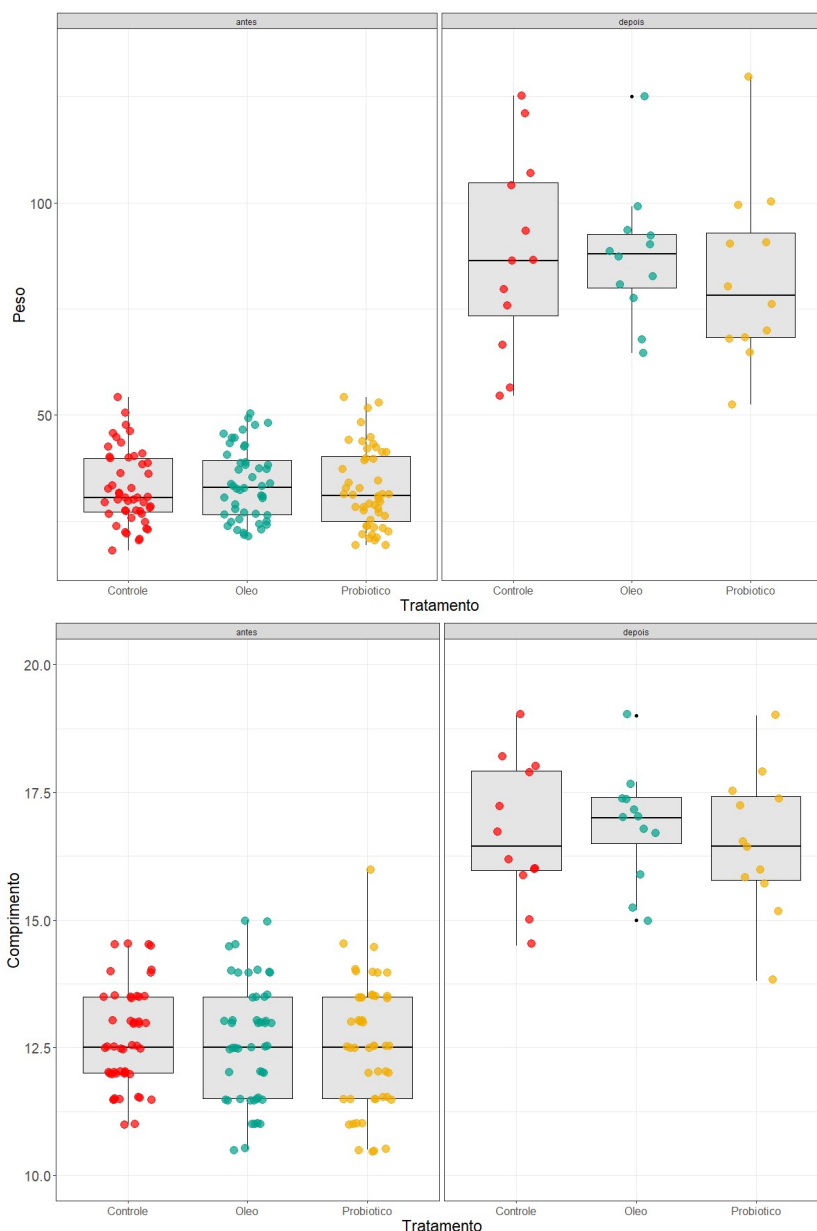
A partir desses valores pode-se determinar o crescimento e o ganho de peso dos peixes por tratamento (**Tabela 16**).

**Tabela 16:** Crescimento (cm) e ganho de peso totais

| Tratamentos | Crescimento Total<br>(cm) | Ganho de Peso<br>Total (g) |
|-------------|---------------------------|----------------------------|
| Controle    | 4,15± 0,23 <sup>a</sup>   | 623,04± 35,19 <sup>a</sup> |
| Probiótico  | 4,02± 0,08 <sup>a</sup>   | 604,04± 22,46 <sup>a</sup> |
| Óleo Canela | 3,65± 0,41 <sup>a</sup>   | 564,2± 97,25 <sup>a</sup>  |

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

Por fim, observou-se que durante os 35 dias de suplementação os peixes cresceram e ganharam biomassa uniformemente, sem nenhuma diferença significativa entre os diferentes tratamentos (p>0,05), como pode ser melhor notado na **Figura 40**.



**Figura 40:** Gráficos do tipo Boxplots demonstrando as variações do peso (g) e comprimento (cm) entre tratamentos durante 35 dias

Após obter o resultado do ganho de peso total foi possível calcular as taxas de conversão alimentar (TCA) para cada tratamento, detalhadas na Tabela 17 abaixo:

Ao interpretar a tabela da TCA, foi observado que o tratamento com óleo de canela apresentou maior taxa de conversão alimentar, ou seja, requerendo maior quantidade de ração fornecida para alcançar o ganho de peso (aproximadamente uma grama a mais de ração por grama de peso ganho) em comparação com tratamento com probiótico e o tratamento controle que obtiveram valores de taxa de conversão alimentar similares.

**Tabela 17:** Taxa de Conversão Alimentar (TCA) determinada para cada tratamento em gramas

| TRATAMENTOS | TCA (g)           |
|-------------|-------------------|
| Controle    | 8,32 <sup>a</sup> |
| Probiótico  | 8,58 <sup>a</sup> |
| Óleo Canela | 9,12 <sup>b</sup> |

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). TCA= Taxa de Conversão Alimentar

Ao analisar os resultados, a falta de diferenças significativas entre os tratamentos para o peso e crescimento final dos peixes não é exclusiva deste trabalho. Ao se tratar do probiótico, CASTRO *et al.* (2021) também observou a ausência de diferenças significativas no desempenho zootécnico em pós larvas de tilápia-do-nilo após a suplementação de diversas concentrações de probiótico do gênero *Bacillus*. Já SILVA *et al.* (2021) realizou sua pesquisa com juvenis de tilápia-do-nilo, o mesmo que neste trabalho, comparando as interferências, no peso e comprimento corporal, da suplementação entre dois probióticos: um complexo de bactérias e o outro apenas constituído pela cepa *Bacillus subtilis*, apesar de serem dois probióticos distintos, ambos não expressaram nenhuma diferença no desenvolvimento dos peixes em 53 dias. Porém, um resultado diferente foi encontrado no trabalho de XIA *et al.* (2019) utilizando também aditivos do gênero *Bacillus* (*B. subtilis* e *B. cereus*) e verificando um aumento de peso e melhora na conversão alimentar, ou seja, diminuição da taxa de conversão alimentar de tilápias-do-nilo. Já ABOU-EL-ATTA *et al.* (2019), utilizou a linhagem *Lactobacillus plantarum*, um dos gêneros mais encontrados na formulação da Flora5 utilizada no presente trabalho, como aditivo alimentar de Tilápias-do-Nilo, observando maior crescimento dos peixes com uma melhor conversão alimentar, porém com um gasto maior na alimentação por ter induzido uma maior ingestão de ração.

Essas diferenças no desenvolvimento dos peixes podem ser causadas por diversas variantes como: características das linhagens probióticas, concentração do probiótico, tempo de suplementação, tipo de manejo adotado, composição das dietas e o nível de estresse que os animais são submetidos (MOHAMED; JOHN, 2008; ALY *et al.*, 2008). As diferenças no desempenho dos peixes entre distintas linhagens probióticos podem ser verificadas na pesquisa de OPIYO *et al.* (2019) ao comparar os efeitos benéficos de uma cepa fúngica (*Saccharomyces cerevisiae*) com uma cepa bacteriana (*Bacillus subtilis*), obtendo melhores resultados para o crescimento, com maior peso, comprimento em tilápias-do-nilo suplementadas com *S. cerevisiae*, além de uma excelente taxa de conversão alimentar, porém ambos os probióticos demonstraram maior desempenho do que os peixes utilizados no tratamento sem aditivos. Em

contrapartida, a concentração do probiótico a ser utilizado também tem grande influência nos resultados, como foi averiguado por ABARIKEA *et al.* (2018), na qual todos os peixes alimentados com quatro concentrações (3g, 5 g, 7g e 10g) do probiótico comercial BS, composto por duas espécies do gênero *Bacillus* (*B. Subtilis* e *B. Lincheniformis*) apresentaram ganho de peso e comprimento em comparação ao controle, porém foi a concentração de 10g/kg que apresentou melhor desempenho.

Os resultados deste trabalho se referem a suplementação de 35 dias, uma média de tempo utilizada por diversos autores, como aqueles citados acima, contudo, alterações no intervalo de suplementação podem ser a chave para oscilações nos resultados, como foi no caso do trabalho de ALY *et al.*(2008) que realizaram seu experimento utilizando também uma mistura probiótica (*Lactobacillus acidophillus* e *Bacillus subtilis*) porém suplementando por 56 dias, quase o dobro de dias utilizados neste presente trabalho, atingindo resultados diferentes com uma maior taxa de ganho de crescimento. Essas variações nos resultados advindas de diferentes intervalos de tempo podem ser melhor visualizadas no trabalho de SILVA *et al.* (2020), na qual teve o objetivo de documentar as variações de peso, comprimento e taxa de conversão alimentar em alevinos de *Oreochromis niloticus* suplementados com uma mistura probiótica (*Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcusfaecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillusplantarum* e *Pediococcus acidilactici*) em quatro períodos de tempo: 30, 60 e 90 dias. Durante esses períodos, nenhuma diferença no peso dos alevinos em 30 dias de criação, no entanto, em 60 dias, os peixes alimentados com o probiótico tiveram um peso maior em comparação com o controle, tendo também uma melhora de 14% da conversão alimentar. Já os autores TACHIBANA *et al.* (2020) adotaram uma outra estratégia para alavancar resultados promissores, atestando a eficácia da alternância de 7 dias da dieta com probiótico com a dieta normal (sem aditivos) para o desenvolvimento de tilápias-do-nilo.

Em relação ao uso de óleo essencial de canela em peixes, alguns trabalhos também constatarem a ausência de variações no desempenho dos peixes suplementados em comparação com o grupo controle, como é o caso da pesquisa realizada por SARY *et al.* (2018) ao suplementar juvenis de Tilápia-do-Nilo com duas concentrações (0,35 e 0,70 gramas/Kg de ração) de óleo de canela por 45 dias, não obtendo modificações no desenvolvimento dos peixes. Não diferindo dos resultados de DEDI *et al.* (2016) ao utilizar outra espécie de peixe: a carpa-comum (*Cyprinus carpio*) com a suplementação de óleo de canela nas concentrações 0%, 0.25%, 0.5%, 0.75% e 1%, afetando de forma insignificante o crescimento e a taxa de

sobrevivência dos peixes.

Poucos trabalhos da atualidade ainda utilizam o óleo de canela na sua integridade, empregando mais o composto cinamaldeído. O cinamaldeído é um álcool terpênico com baixa solubilidade em água e alta volatilidade, sendo o componente majoritário do óleo de canela (GOMES; MOREIRA; CASTELL-PEREZ, 2011). Contudo, a concentração de cinamaldeído difere não só entre espécies diferentes da planta canela, como também variam entre: indivíduos de uma mesma espécie, em ambiente diferentes e entre distintos estados de uso do composto (pó ou óleo) (AFIFI *et al.*, 2009).

O maior uso do cinamaldeído ao invés do óleo de canela é explicado nas pesquisas científicas pelo alcance de melhores resultados para a saúde dos peixes, dentre eles estão: um maior ganho de peso e um maior crescimento, como foi alcançado na pesquisa de AMER; METWALLY E AHMED (2018) ao utilizar 2ml/kg de cinamaldeído na alimentação de tilápias. Contudo, dosagens diferentes do cinamaldeído podem provocar diferenciações nos resultados, como por exemplo, a aplicação de duas dosagens (1% e 1,5%) utilizadas por MOHAMMAD (2021) em carpas-comum (*Cyprinus carpio*), na qual, a dosagem de 1,5% atingiu maiores taxas de crescimento e melhores taxas de conversão alimentar em comparação com a dosagem 1%, que não obteve diferenças significativas para o peso e comprimento. Esses resultados só afirmam o que foi proposto por RAESI *et al.* (2016), que esclarece que as atividades, tanto do óleo de canela quanto do cinamaldeído está correlacionadas com a concentração do composto cinamaldeído, tendo maiores atividade na presença do composto majoritário cinamaldeído em elevada concentração.

Apesar de não ter havido diferenças significativas no desenvolvimento dos animais neste trabalho, a oportunidade de utilizar o cinamaldeído isolado neste trabalho seria uma provável opção para alcançar resultados mais favoráveis aos compostos bioativos obtidos de plantas. Essa permissão pode ser embasada nos resultados obtidos por NEHAD *et al.* (2020) que comparou as atividades de um probiótico Levabon® com o produto Biotronic® composto por cinamaldeído, nas mesmas concentrações, obtendo melhor desempenho com o produto Biotronic®.

### 3.3. SOBREVIVÊNCIA E SINAIS CLÍNICOS DE DOENÇA

Após a infecção experimental dos peixes com a cepa *Aeromonas hydrophila*, verificou-se a taxa de sobrevivência dos peixes e a presença ou não de sinais clínicos da doença. Só para constatar, dois peixes, um do tratamento controle e outro do tratamento com probiótico, logo após a realocação deles nos aquários, morreram antes da infecção, tendo o

estresse como provável causa. Porém os peixes sobreviventes estavam sem nenhuma indicação de doenças ou ferimentos que possam interferir nos resultados posteriores.

Apenas um peixe do tratamento controle apresentou sinais clínicos da doença em 24 horas, dentro destes sinais observou coloração corporal alterada, feridas no corpo, hemorragia localizada na base da nadadeira e hemorragia interna generalizada, o que levou a morte deste animal. Nenhum peixe dos tratamentos com probiótico e óleo de canela tiveram óbitos ou demonstraram sintomas em 24 horas e 48 horas. E após 96 horas, um outro peixe do tratamento controle veio a óbito com sintomas de bacterioses.

Depois de 7 dias da terceira coleta (08/10), ou seja, 216 horas da após a inoculação do patógeno foi realizada uma nova coleta (15/10) apenas para verificar o estado de saúde dos peixes. Nesta coleta, os peixes do tratamento controle apresentaram-se mais doentes e clinicamente mais comprometidos em relação aos tratamentos com probiótico e óleo, com caudas e nadadeiras corroídas, boca avermelhada, olhos saltados (exoftalmia), petéquias espalhadas pelo corpo, hemorragias visíveis na base das nadadeiras, tendo em média 5 peixes comprometidos dentre 9 peixes que sobreviveram as primeiras horas de infecção.

Em relação ao tratamento com óleo de canela, 6 peixes de 11 apresentaram comprometimento da sua saúde, sendo que um desses seis peixes morreu no mesmo dia da coleta final. Os sinais clínicos foram similares aos encontrados no controle, porém de forma mais branda, como: cauda e nadadeiras corroídas, boca avermelhada, pequena hemorragia na base das nadadeiras e manchas e petéquias espalhadas pelo corpo. Os peixes do tratamento com probiótico Flora 5 foram os que manifestaram melhor condição de saúde, com 3 peixes de 11 com sinais clínicos de bacteriose, como: manchas avermelhadas na base das nadadeiras (início de hemorragia), manchas e petéquias centralizadas no abdômen e coloração corporal mais escura.

Todos os sinais clínicos observados nos peixes neste capítulo (**Figura 41**) foram assegurados como sintomas de aeromonose de acordo com AUSTIN; AUSTIN (2016), que descreve sintomas semelhantes averiguados em peixes contaminados por *Aeromonas* spp.



**Figura 41:** Sinais clínicos de septicemia causados pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. **A:** Manchas e petéquias no abdômen. **B:** Cauda corroída. **C:** Olho saltado (exoftalmia). **D:** Hemorragia generalizada.

Ao converter todos esses dados em percentagem de sobrevivência, o tratamento com probiótico foi o que apresentou, em 5 dias após a infecção do patógeno, maior taxa de sobrevivência de 100%, ou seja, não ocorreu mortes provocadas pela bactéria neste tratamento durante esses 5 dias. Em ordem decrescente de sobrevivência, o óleo de canela obteve uma percentagem de sobrevivência de 97,9%, uma taxa de sobrevivência mais vantajosa do que o tratamento controle com 95,7%. Em síntese do panorama geral, a manutenção da saúde dos peixes seguiu a ordem decrescente: Probiótico > Óleo de Canela > Controle, na qual o tratamento com probiótico conseguiu manter uma maior saúde e integridade dos peixes, seguido pelo óleo de canela em comparação ao tratamento controle.

Resultados positivos para a sobrevivência dos peixes a doenças utilizando probióticos foram documentados por outros autores. MEIDONG *et al.* (2017) que conseguiu obter uma elevada taxa de sobrevivência (87,6%) contra *Aeromonas hydrophila* em tilápias-do-nilo alimentadas com a cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* em comparação com uma taxa de 12,5% do tratamento controle. WON *et al* (2020) observou uma maior taxa de

sobrevivência para duas linhagens diferentes de probióticos (*B. subtilis* e *L. lactis*) em relação ao grupo controle, que teve registro de mortalidades já no terceiro dia de infecção por *A. hydrophila*, não percebendo diferenças nas atividades entre essas duas linhagens probióticas. Porém, KUEBUTORNYE *et al.* (2020) observou variações na atividade inibitória de linhagens do gênero *Bacillus* (*Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*) com a atividade inibitória de uma mistura probiótica composta por esses três gêneros já citados, na qual obteve-se maior taxa de sobrevivência peixes alimentados com a mistura, deduzindo que misturas probióticas, como Flora 5 utilizada neste trabalho, apresentam maiores interações negativas contra a bactéria patogênica e positivas para a saúde dos peixes do que as linhagens isoladas.

Em relação às doenças, as bactérias patogênicas podem manifestar-se como mais vulnerável ou resistente para diferentes tratamentos. TAN; CHEN; HU (2019) perceberam que a bactéria patogênica *A. hydrophila* era mais resistente a linhagem probiótica *Rummeliibacillus stabekisi*, isolada do intestino de Tilápias-do-Nilo do que o patógeno *S. iniae*, com taxa de sobrevivência de 56,7% e 63,3 %. A constatação de que *Aeromonas hydrophila* tem um perfil mais resistente a tratamentos com probióticos também foi visualizado por CHEN; LIU; HU (2018), porém utilizando a linhagem probiótica *Paenibacillus ehimensis*.

Outros componentes podem ser misturados aos aditivos alimentares nas suas formulações com a finalidade de trazer maiores benefícios, desempenhando o papel de auxiliares, normalmente de origem vegetal ou mineral (TIENG TAM *et al.*, 2017). Como é o caso dos prebióticos que acabam auxiliando os probióticos na modulação da microbiota intestinal e do sistema imune (RINGØ *et al.*, 2010). Esse auxílio pode ser observado na pesquisa de CAVALCANTE *et al.* (2020) na qual obteve-se menores taxas de mortalidade de peixes por septicemia de *Aeromonas hydrophila* ao utilizar a combinação de probiótico comercial (*Bifidobacterium* sp, *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecium*) com prebiótico (MOS) ao comparar com o tratamento onde utilizou somente o probiótico como suplemento.

Além do probiótico, o uso de óleo de canela neste presente trabalho também resultou em efeitos benéficos para os peixes, porém com uma taxa de sobrevivência menor do que a sobrevivência observada no tratamento com probiótico, contudo ainda representando uma vantagem para a saúde do hospedeiro ao comparar com a mortalidade do grupo controle. Um ótimo desempenho do óleo de canela frente ao patógeno *Aeromonas hydrophila* também foi obtido por AHMAD *et al.* (2011) com uma mortalidade em tilápias-do-nilo de 9 a 12 %, 77% menor do que a taxa de mortalidade do grupo controle (89%).

O poder antimicrobiano do óleo de canela pode afetar outros patógenos além do gênero *Aeromonas* spp. ALSAID *et al.* (2010) verificou esse mesmo potencial antimicrobiano do óleo de canela contra o patógeno *S. agalactiae* em tilápias vermelhas híbridas. Já RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN (2010) classificaram o óleo de canela como um forte antagonista da bactéria patogênica *S. iniae* em tilápias-do-nilo. A ação benéfica do óleo de canela também impacta outras espécies de peixes, como visto na pesquisa de HABIBA *et al.* (2021), na qual concluiu que o óleo de canela apresentou alta eficiência na sobrevivência e performance de peixes conhecidos como robalo (*Dicentrarchus labrax*).

Essa ação antagonista contra *Aeromonas hydrophila* não é exclusiva do óleo de canela, como também foi verificado que outros óleos essenciais agem contra esse patógeno, como é o caso do óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) (SOUZA *et al.*, 2016), óleo de orégano (*Origanum vulgare*) (SEDEN; ABBASS; AHMAD, 2009) e óleo de gengibre (*Zingiber officinale*) (NALIATO *et al.*, 2020), com beneficiamento de 90 % na saúde dos peixes. Por fim, tanto este trabalho quanto de ALI *et al.* (2020) nomearam o óleo de canela e probiótico como competentes protetores da saúde dos peixes devido à redução de mais de 90% da taxa mortalidade dos peixes por *Aeromonas hydrophila*.

### 3.4. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

As variáveis sanguíneas e bioquímicas (hematócrito, PPT, hemoglobina, eritrócitos e glicose) obtidas nas 3 coletas (coleta 0, 24 e 48 horas após a infecção pelo patógeno) estão contidas na **Tabela 18**.

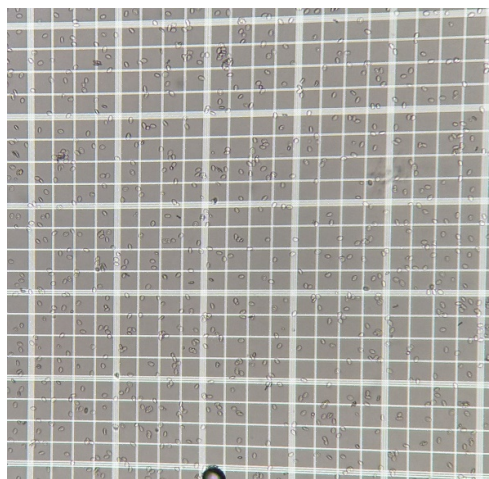
A análise dos parâmetros hematológicos para compreensão da fisiologia dos peixes foi proposta por HESSER (1960). Esses dados podem ser muito utilizados para a verificação do estado de saúde dos peixes, podendo através deles prever enfermidades em estágios iniciais de alterações para que assim consiga realizar tratamentos precoces (AZEVEDO *et al.*, 2011). Dentre as vantagens de utilizar o perfil hematológico dos peixes como diagnóstico estão: facilidade da análise ao utilizar kits de diagnóstico laboratoriais, realização de grande número de amostras em curto período de tempo e a não obrigatoriedade de levar o animal à eutanásia (MAITA, 2007).

**Tabela 18:** Perfil hematológico e bioquímico dos peixes expostos aos três tratamentos em três coletas realizadas.

| Variáveis Sanguíneas |             |                   |                |                          |                                            |                              |
|----------------------|-------------|-------------------|----------------|--------------------------|--------------------------------------------|------------------------------|
| Horas                | Tratamentos | Htc. (%)          | PPT            | Hb (g dL <sup>-1</sup> ) | Erit. (x10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) | Glic. (mg dL <sup>-1</sup> ) |
| 0                    | Controle    | 28,55±<br>14,13 a | 4,81±<br>0,6 a | 6,35±<br>0,6 a           | 1,45 ±<br>0,2 a                            | 35,67±<br>4,7 a              |
|                      | Probiótico  | 27,93±<br>3,05 a  | 4,46±<br>0,6 a | 6,98±<br>0,7 a           | 1,27 ±<br>0,4 a                            | 33,42±<br>5,9 a              |
|                      | Óleo Canela | 26,25±<br>1,71 a  | 3,83±<br>0,3 b | 7,30±<br>0,8 b           | 1,15±<br>0,3 a                             | 29,25±<br>6,9 a              |
| 24                   | Controle    | 29,75±<br>0,84 a  | 3,42±<br>0,7 a | 6,35±<br>0,5 a           | 1,55 ±<br>0,2 a                            | 38,17±<br>11,8 a             |
|                      | Probiótico  | 27,84±<br>1,35 a  | 4,00±<br>0,6 a | 6,50±<br>0,8 a           | 1,66 ±<br>0,3 a                            | 31,42±<br>6,0 a              |
|                      | Óleo Canela | 28,41±<br>1,29 a  | 3,66±<br>0 a   | 6,87±<br>0,5 b           | 1,61±<br>0,3 a                             | 34,75±<br>8,9 a              |
| 48                   | Controle    | 29,42±<br>1,03 a  | 3,58±<br>0,3 a | 7,21±<br>0,5 a           | 1,59 ±<br>0,3 a                            | 38,83±<br>8,3 a              |
|                      | Probiótico  | 28,58±<br>1,37 a  | 3,67±<br>0,3 a | 7,44±<br>1,4 b           | 1,25±<br>0,3 a                             | 42,92±<br>12,8 a             |
|                      | Óleo Canela | 28,58±<br>1,37 a  | 4,0±<br>0,3 b  | 7,12±<br>1,0 a           | 1,18±<br>0,1 a                             | 30,5±<br>5,4 a               |

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). Htc= Hematócrito. PPT= Proteína Plasmática Total. Hb= Hemoglobina. Erit= Eritrócitos. Glic.= Glicose.

Neste experimento, foi estudado a influência tanto dos diferentes tratamentos quanto o tempo antes e depois da infecção experimental nos parâmetros hematológicos dos peixes nas três coletas. Em relação a glicemia, não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém no tratamento com probiótico ocorreu aumento desse índice ao longo das três coletas (p=0,03). Variações crescentes ao longo do tempo de infecção também foi possível de observar no perfil do hematócrito no tratamento controle (p<0,01), sem obter nenhuma variação comparando entre os tratamentos. Já o número de eritrócitos (**Figura 42**) não diferiu nem entre os tratamentos, nem entre os períodos das coletas.



**Figura 42:** Número de eritrócitos obtido pela contagem em Câmara de Neubauer

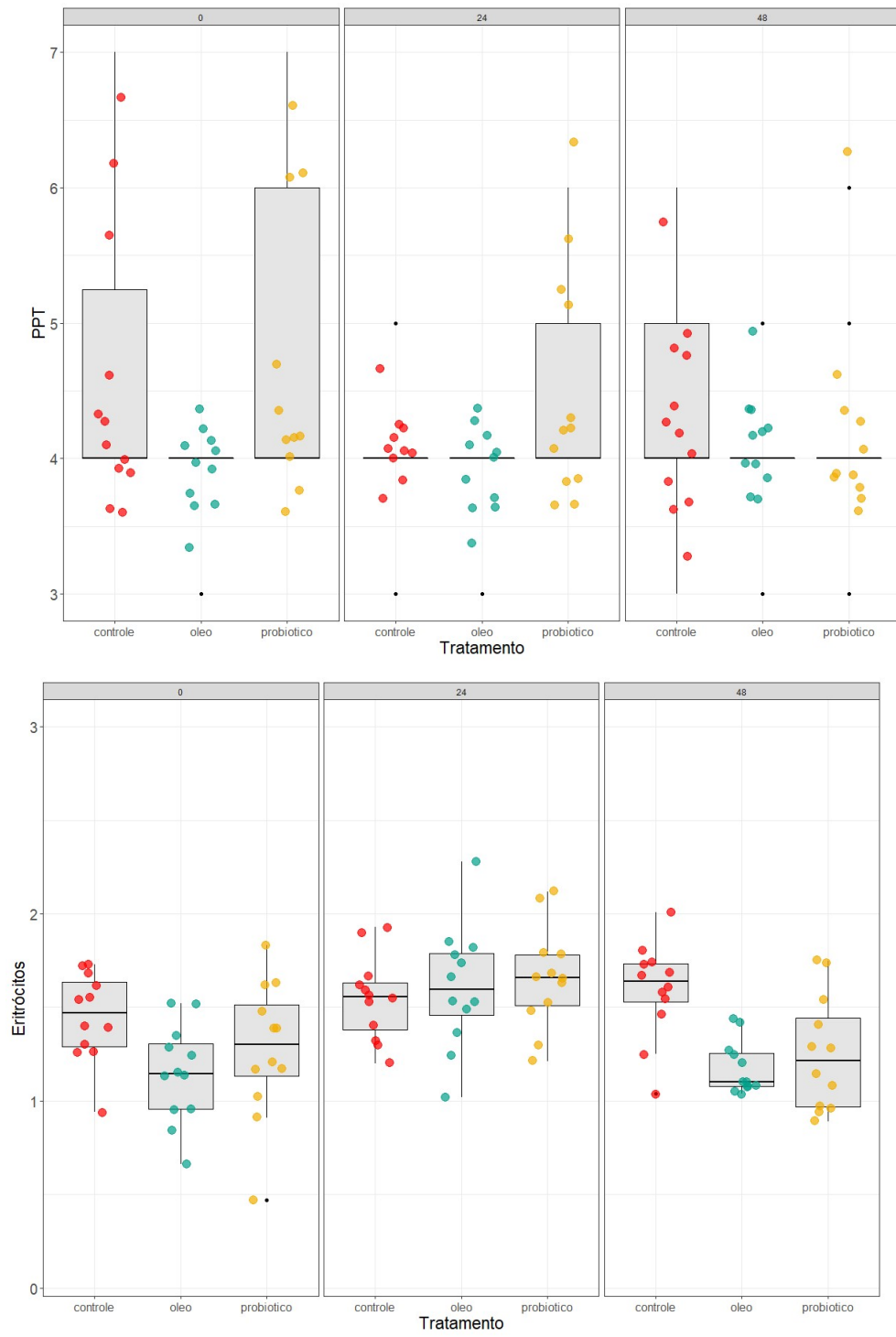
As variações ao longo do tempo, ou seja, entre as coletas e a falta de variações entre os tratamentos podem estar relacionadas com o aumento do estresse na manutenção dos peixes, principalmente o estresse mecânico pela captura e anestesiamento dos animais com pouco intervalo entre as coletas para que os animais pudessem voltar ao estado equilibrado, já que de acordo com HOSEINI *et al.* (2019), o estresse pelo manuseio pode acarretar alterações nos padrões hematológicos, como ocorreu na pesquisa de SUTTHI; DOAN (2020) ao analisar as consequências do estresse de tilápias-do nilo em transporte de 4 horas, na qual a glicose foi o parâmetro sanguíneo que mais sofreu alterações, porém ao adicionar duas cepas de probióticos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus* spp) na alimentação dos peixes, as alterações hematológicas não se tornaram muito significativas.

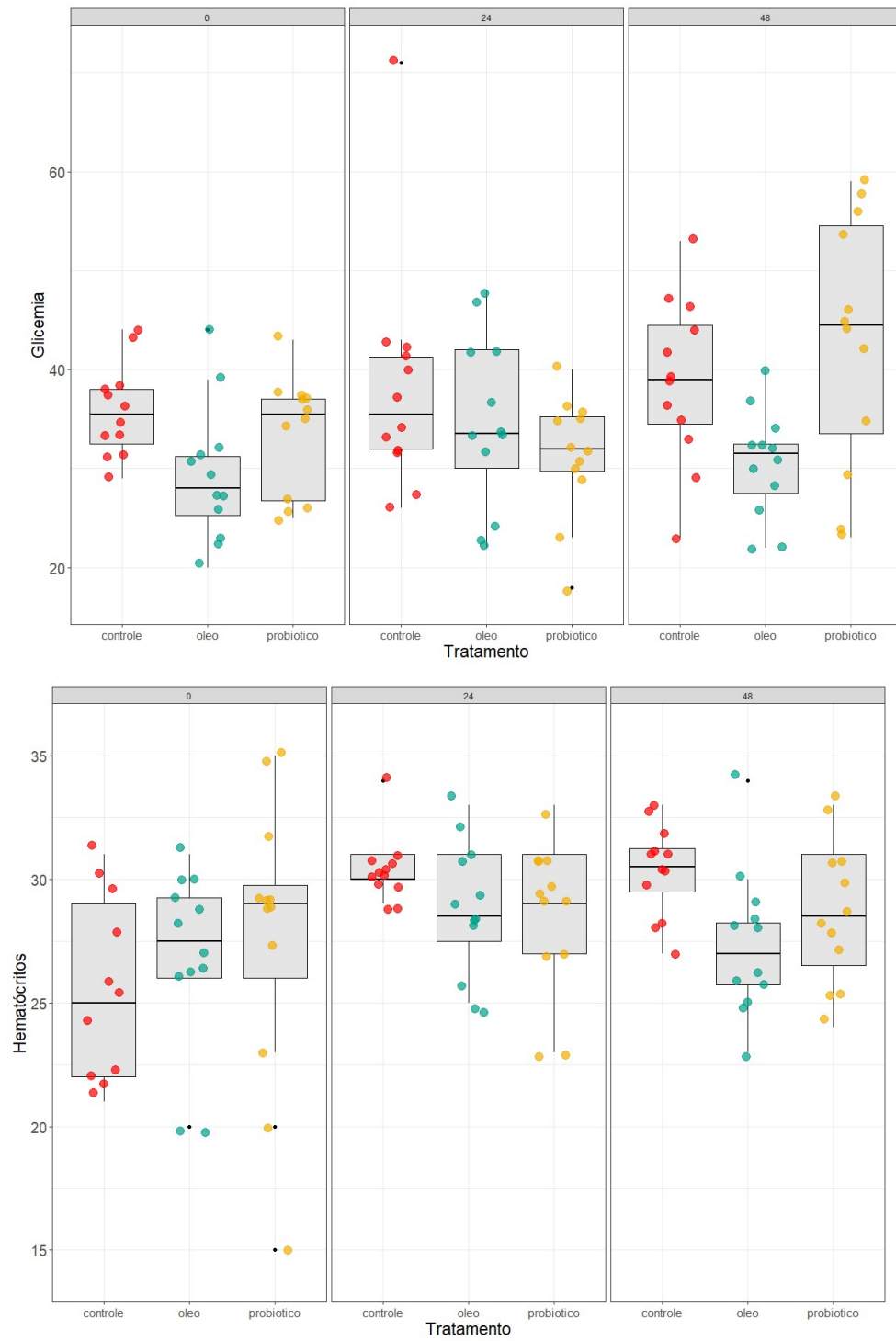
A falta de modificações, entre os tratamentos, nos parâmetros hematológicos citados acima também foi observada na pesquisa de SILVA *et al.* (2021) ao incluir tanto um complexo bactérias como cepas de *Bacillus subtilis* em dietas de juvenis de tilápia do Nilo. E NAKANDAKARE *et al.* (2013) argumentou que ausência de diferenças significativas nas composições sanguíneas no seu estudo ao suplementar tilápias-do-nilo com probiótico PAS TR® é um indicativo de que a saúde dos peixes se encontra em manutenção, já que parâmetros hematológicos da série vermelha dizem respeito ao estado geral da saúde dos peixes. Já para os testes utilizando óleos essenciais, ROJAS (2021) também não observou nenhuma alteração nos parâmetros hematológicos em relação ao controle, utilizando uma mistura comercial de óleos essenciais (Emerald ®), tendo como composto principal o óleo de canela, na alimentação de tilápias-do-nilo por 60 dias. Essa explicação também pode ser aplicada para este presente

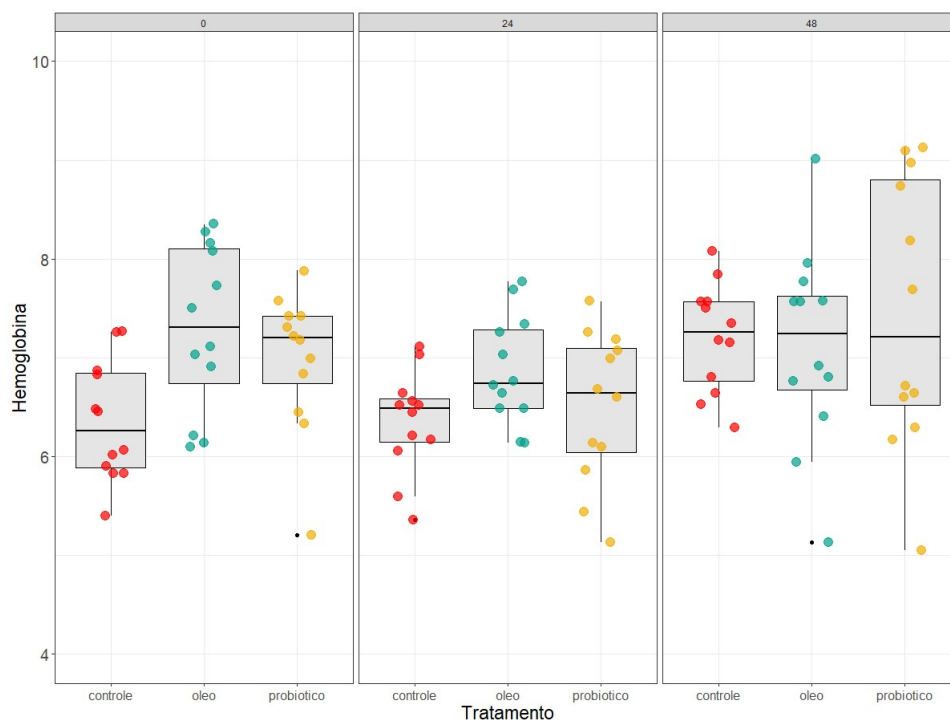
estudo já que o estado de saúde dos peixes antes da infecção experimental estava em harmonia e a manutenção da maioria dos parâmetros hematológicos mesmo após a infecção ressalta que por 48 horas a saúde dos peixes permaneceu intacta, conferindo aos probióticos o papel de bom mantenedor da sanidade de peixes, mesmo papel dado por MOUSTAFA *et al.* (2020) ao probiótico composto por misturas de linhagens do gênero *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus*) por recuperar os valores de hematócrito, hemoglobina, proteína total e glicose prejudicados pela infecção do patógeno *S. Iniae* em tilápias-do-nilo.

Resultados distintos deste presente estudo foram encontrados por AMIR *et al.* (2019), que ao suplementar Carpas rohu (*L. Rohita*) com o fungo probiótico *G. ccandidum* observaram aumento significativo nos seguintes índices: eritrócito, leucócito, hematócrito, hemoglobina, VCM e CHCM. GAYED *et al.* (2021) também documentou o aumento de diversos parâmetros hematológicos em peixes após suplementados com um probiótico comercial (Zado®). Contudo, neste presente trabalho, apenas dois parâmetros sanguíneos tiveram variações entre os diferentes tratamentos. Já HABIBA *et al.* (2021) verificou o aumento de todos os parâmetros hematológicos (hemoglobina, hematócrito, glicose e eritrócitos) em peixes (*Dicentrarchus labrax*) tratados com óleo de canela por 90 dias.

Nos resultados da análise da hemoglobina, os valores do tratamento controle diferiram do tratamento com o óleo de canela de forma mais significativo ( $p < 0,01$ ) e com o tratamento com probiótico de forma mais moderado, na qual, nas coletas 0 e 24 horas, a concentração de hemoglobina no tratamento com óleo de canela era menor do que nos outros tratamentos, porém na coleta de 48 horas esses papéis se invertem, tendo o tratamento com óleo de canela concentrações maiores de hemoglobina em comparações com os outros tratamentos, além dos valores terem aumentado para o tratamento controle ao longo do tempo ( $p = 0,03$ ). De acordo com DAHIYA; SIHAG; GAHLAWAT (2012) esse aumento nos níveis de hemoglobina em peixes tratados com probióticos é explicado pela presença de um maior número de células carreadoras de oxigênio que auxiliam nas atividades metabólicas dos peixes. Ou seja, o aumento da hemoglobina em peixes apresenta a função de controlar a transmissão de gases respiratórios no sangue e assim, aumentando a eficiência cardíaca (GAZERANI; FARAHANI, 2009). Outro parâmetro com variações entre os tratamentos foi o PPT (proteína plasmática total), na qual o tratamento do controle diferiu significativamente do tratamento com óleo de canela ( $p = 0,01$ ), além disso, para o tratamento probiótico os valores diferiram também ao longo do tempo ( $p = 0,02$ ). A presença ou não de variações nestes parâmetros podem ser melhores visualizadas nos gráficos contidos na **Figura 43**.







**Figura 43:** Gráficos do tipo Boxplots representando as variáveis hematológicas nos três diferentes momentos (coletas) da infecção por *Aeromonas hydrophila*

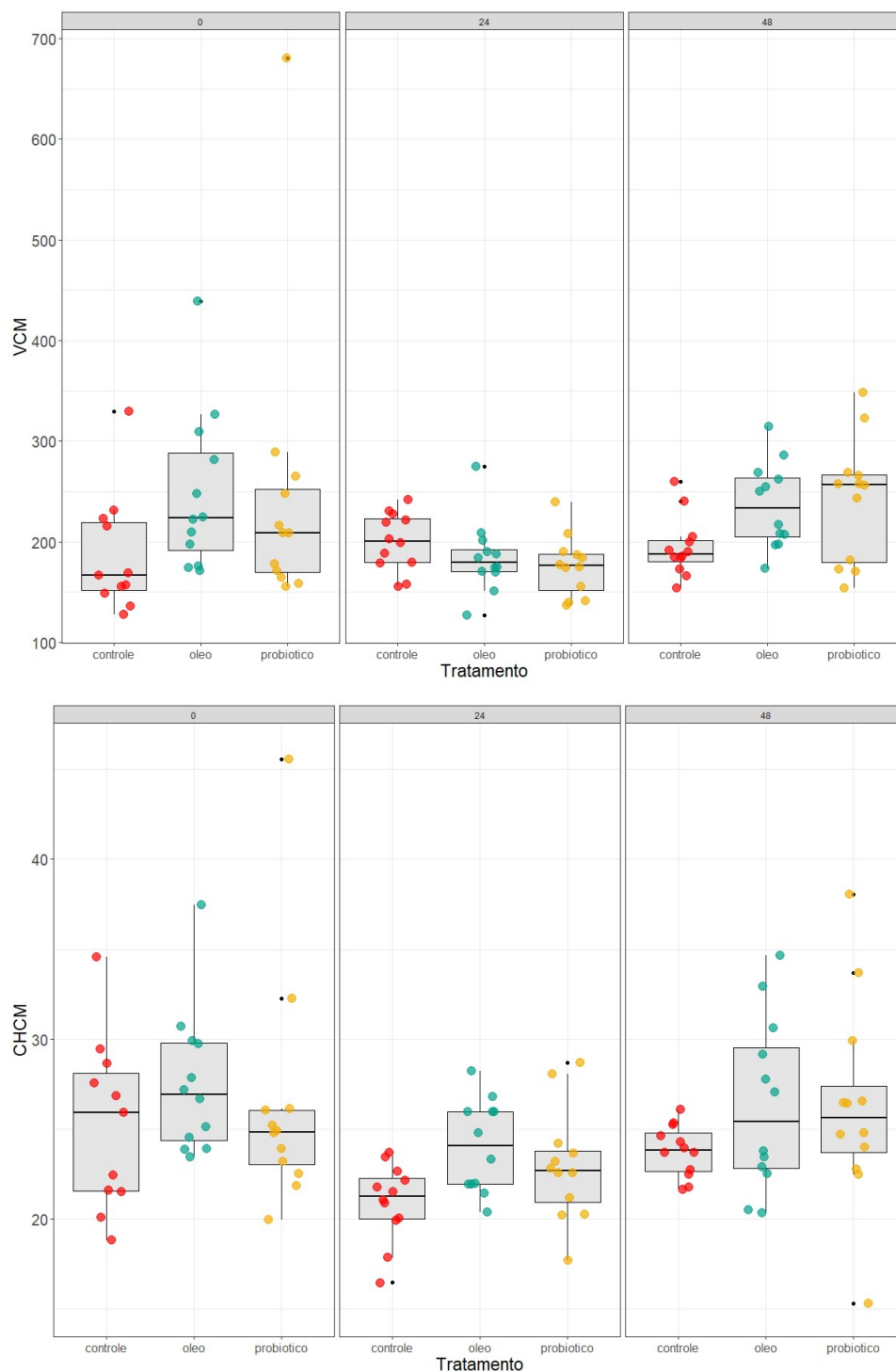
A partir da contagem do número de eritrócito e a determinação da concentração de hemoglobina foi possível calcular os índices hematimétricos, contidos na **Tabela 19**. O índice VCM (volume corpuscular médio) avalia o volume dos eritrócitos e o índice CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) que estabelece a concentração de pigmento nos eritrócitos (NAGATA *et al.*, 2009). Nesta pesquisa, tanto os valores VCM e CHCM não diferiram nem entre os tratamentos nem nos três momentos da infecção. A **Figura 44** consegue representar melhor a ausência de diferenças entre VCM e CHCM.

**Tabela 19:** Índices Hematimétricos calculados para os diferentes tratamentos em três momentos (coletas) da infecção por *Aeromonas hydrophila*

| ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS |             |                             |                           |
|------------------------|-------------|-----------------------------|---------------------------|
| Horas                  | Tratamentos | VCM                         | CHCM                      |
| 0                      | Controle    | 187,35 ± 58,93 <sup>a</sup> | 25,21 ± 4,77 <sup>a</sup> |
|                        | Probiótico  | 216,05 ± 56,34 <sup>a</sup> | 26,35 ± 6,76 <sup>a</sup> |
|                        | Óleo Canela | 248,23 ± 79,52 <sup>a</sup> | 27,52 ± 4,03 <sup>a</sup> |
| 24                     | Controle    | 200,21 ± 28,62 <sup>a</sup> | 20,94 ± 2,14 <sup>a</sup> |
|                        | Probiótico  | 175,70 ± 30,05 <sup>a</sup> | 22,92 ± 3,12 <sup>a</sup> |
|                        | Óleo Canela | 184,53 ± 35,73 <sup>a</sup> | 24,04 ± 2,54 <sup>a</sup> |
| 48                     | Controle    | 194,37 ± 29,72 <sup>a</sup> | 23,58 ± 1,42 <sup>a</sup> |
|                        | Probiótico  | 241,61 ± 61,15 <sup>a</sup> | 26,26 ± 5,74 <sup>a</sup> |
|                        | Óleo Canela | 236,23 ± 42,49 <sup>a</sup> | 26,30 ± 4,79 <sup>a</sup> |

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

VCM= Volume Corpuscular Médio. CHCM= Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média



**Figura 44:** Gráficos do tipo Boxplots expressando os valores de VCM E CHCM nos três diferentes momentos (coletas) da infecção por *Aeromonas hydrophila*

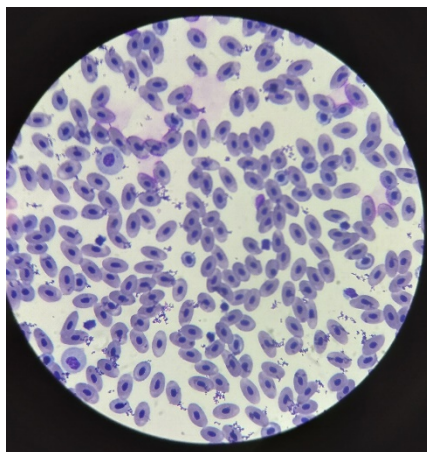
Resultados similares para o tratamento probiótico foram encontrados por MEHDINEJAD; IMANPOUR; JAFARI (2017) ao notar um aumento principalmente nos índices de hemoglobina ao suplementar por 6 meses a ração de peixes Kinguios (*Carassius auratus*) com a linhagem probiótica *Pedicoccus acidilactici* e que de acordo com esses autores, esse aumento nos parâmetros hematológicos pode indicar uma melhora no sistema imunológico dos peixes. Seguindo o mesmo preceito dos autores anteriores, MAKLED *et al.* (2019) quis verificar se o aumento nos índices hematológicos é proporcional à concentração de probiótico usado ao utilizar duas concentrações (0,5 e 1 %) do probiótico *Psychrobacter maritimus* em tilápias-do-nilo, contudo não houve diferenças significativas entre essas duas concentrações, porém ocorreu diferenças entre os tratamentos com probiótico ao comparar com o tratamento controle, com aumento nos níveis de hemoglobina e hematócrito. Ao se tratar de pesquisas utilizando óleos essenciais, AMIRI; BAHREKAZEMI (2017) observou o aumento da hemoglobina em peixes da espécie *Labeotropheus fuelleborni* ao alimentá-los com óleo de canela. Esse aumento no parâmetro da hemoglobina não é exclusivo para peixes que receberam o óleo de canela como aditivo, mas este aumento também foi constatado ao utilizar outros óleos essenciais como aditivos. Como no trabalho de RASHIDIAN *et al.* (2021) que também obteve maiores valores de hemoglobina, além de um aumento nos índices de PPT ao suplementar zebrafishs (*Danio rerio*) com óleo de orégano por oito semanas e após o desafio com a bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila*. ABD EL-NABY *et al.* (2019) verificou maiores valores de hemoglobina em tilápias alimentadas tanto com óleo de tomilho sozinho quanto a mistura do óleo de tomilho com quitosana (prebiótico). Porém NGUGI *et al.* (2015) só conseguiu averiguar que o parâmetro da hemoglobina aumentou nos peixes alimentados com óleo de *Urtica dioica* após o desafio bacterianos com *Aeromonas hydrophila*, indicando que esse acréscimo pode ser uma resposta dos peixes infectados que foi estimulada pelos óleos essenciais, já que nos peixes do controle negativo, ou seja, em peixes alimentados sem aditivos e infectados não apresentaram esse acréscimo no índice de hemoglobina.

Os diferentes resultados encontrados tanto neste trabalho quanto nas pesquisas citadas anteriormente utilizando o perfil hematológico dos peixes para verificar o estado de saúde são comuns e de acordo com AUTHMAN (2015), os efeitos dos aditivos alimentares nos padrões hematológicos de peixes podem ter uma ampla faixa de variação e muitas vezes de forma controversa dependendo da espécie, do sexo, tamanho, hábito alimentar dos peixes, além das condições ambientais também estarem diretamente relacionadas. Se tratando dos óleos essenciais, a concentração do óleo e o tempo de aplicação pode também interferir nas respostas hematológicas. Segundo HARIKRISHNAN *et al.* (2010) dosagens mais elevadas de óleos

essenciais na dieta dos peixes podem causar respostas hematológica diferentes de dosagens mais baixas, suprimindo o sistema imunológico ao mesmo tempo que aumenta a resistência a doenças. E de acordo com GHAFOOR *et al.* (2020) a aplicação de dietas alimentares de longo prazo suplementadas com óleos essenciais geralmente causa um aumento nos parâmetros sanguíneos. Porém TOGHYANI *et al.* (2011), reconhece que alterações sanguíneas não são muito comuns e conhecidas ao utilizar especificamente o óleo de canela.

### 3.5. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E TROMBÓCITOS

Para a contagem de leucócitos e trombócitos, foram realizados ao todo a contagem de 2000 células em 108 lâminas de extensões sanguíneas, diferenciando-as em eritrócitos, leucócitos e trombócitos (**Figura 45**).



**Figura 45:** Células sanguíneas de Tilápia-do-Nilo na objetiva de 100X em um microscópio optico comum durante a contagem de leucócitos e trombócitos.

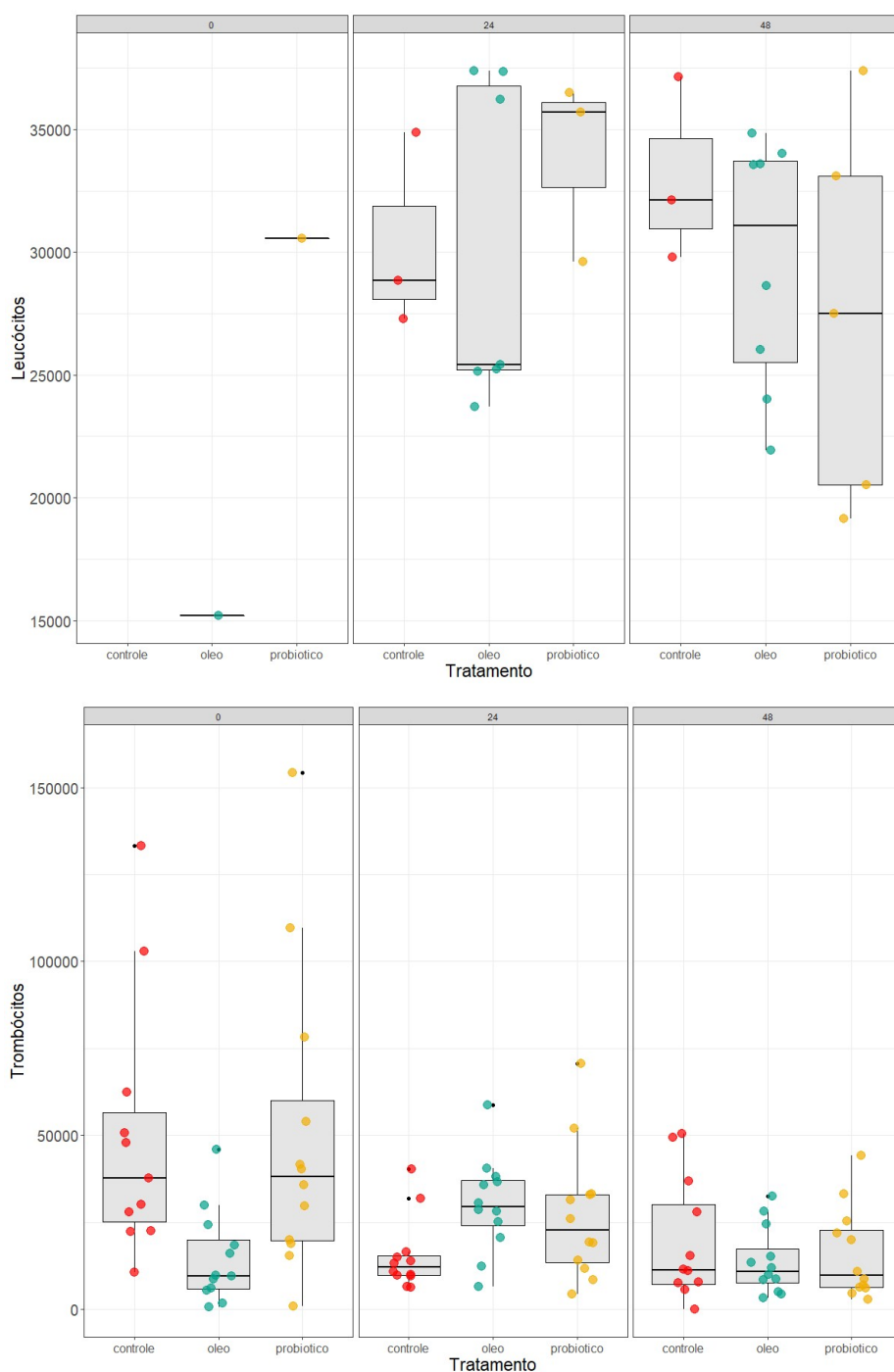
Os valores do leucograma e trombograma estão expressos na **Tabela 20**.

**Tabela 20:** Leucograma e Trombograma resultantes da contagem total de células

| CONTAGENS SANGUÍNEAS |             |                                    |                               |
|----------------------|-------------|------------------------------------|-------------------------------|
| Horas                | Tratamentos | Leucócitos (μL)                    | Trombócitos (μL)              |
| 0                    | Controle    | 145465,8±<br>103782,2 <sup>a</sup> | 62237,1± 55774,6 <sup>a</sup> |
|                      | Probiótico  | 92764,2±<br>78900,1 <sup>a</sup>   | 49833,8± 44220,9 <sup>a</sup> |
|                      | Óleo Canela | 61370,8±<br>23397,3 <sup>b</sup>   | 14707,1± 13228,3 <sup>b</sup> |
| 24                   | Controle    | 51177,9±<br>20166,8 <sup>a</sup>   | 15300,4±10321,4 <sup>c</sup>  |
|                      | Probiótico  | 59400,4±<br>23004,6 <sup>a</sup>   | 26935,4± 19089,0 <sup>c</sup> |
|                      | Óleo Canela | 44369,2±<br>22778,2 <sup>b</sup>   | 30143,3± 13681,9 <sup>b</sup> |
| 48                   | Controle    | 46330,4±<br>11837,6 <sup>a</sup>   | 18620,4± 18096,6 <sup>c</sup> |
|                      | Probiótico  | 47015,0±<br>20943,7 <sup>a</sup>   | 15890,8± 13111,8 <sup>c</sup> |
|                      | Óleo Canela | 37275,0±<br>12507,7 <sup>b</sup>   | 13776,3± 9627,0 <sup>d</sup>  |

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

Em relação a análise estatística, a contagem de leucócitos apresentou diferenças significativas entre os tratamentos controle e óleo canela ( $p<0,01$ ) e diferenças significativas entre os tratamentos controle e probiótico ( $p=0,03$ ), além disso para o tratamento probiótico os valores diferiram também ao longo do tempo ( $p=0,01$ ). Já na contagem de trombócitos, o tratamento controle diferiu significativamente do tratamento óleo ( $p=0,01$ ). E tanto o tratamento controle quanto o tratamento probiótico apresentaram valores diferindo ao longo do tempo ( $p<0,01$ ). Na **Figura 46**, o leucograma e trombograma desta pesquisa estão apresentados em forma de gráficos.



**Figura 46:** Representação do Leucograma e Trombograma em forma de gráficos do tipo Boxplots nos três diferentes momentos (coletas) da infecção por *Aeromonas hydrophila*

Os probióticos são conhecidos por auxiliar na imunidade não específica dos animais devido a diversos mecanismos de ação como: competição nutricional, produção de substâncias antibacterianas ou podem como imunoestimuladores em peixes (SUTILI *et al.*, 2017; MENAGA *et al.*; 2020). Em condições não desafiantes, ou seja, sem a presença de infecções bacterianas, o uso de probióticos em peixes causa um aumento tanto no número de leucócitos quanto no número de trombócitos como visto na pesquisa de DIAS *et al.* (2020), que

verificou maiores quantidade de leucócitos nos peixes matrinxã alimentados com probiótico contendo a cepa *B. subtilis* em relação ao grupo controle. MOHAMMADIAN *et al.* (2019) também averiguou o aumento dos glóbulos brancos após alimentar trutas arco-íris com linhagem *L. bulgaricus* tanto em 45 como em 52 dias.

Com a adição de óleos essenciais na ração de peixes saudáveis, também ocorre o aumento na contagem de leucócitos, como visto por VALLADÃO *et al.* (2019) ao adicionar óleo de tomilho na ração tilápias e alimentá-las por 15 dias. Resultados contrários foram vistos na pesquisa de RAVARDSHIRI *et al.* (2021), na qual a adição de óleo de canela na alimentação de trutas arco-íris não causou elevação nos níveis de leucócitos e trombócitos. KONDERA *et al.* (2021) também não perceberam diferenças significativas no número de leucócitos ao suplementar juvenis da espécie *Cyprinus carpio* tanto com óleo de canela quanto óleo de tomilho, levando a supor que a ação dos óleos essenciais frente ao número de leucócitos e trombócitos podem variar conforme os diferentes usos desses óleos. HARIKRISHNAN *et al.* (2021) foram os autores que confirmaram essa hipótese ao testar os mecanismos de variação do número de leucócitos, para isso alimentou peixes da espécie *Channa striata* com óleo de canela em diferentes dosagens (0, 5, 10, e 15 mg/ kg) e em tempos de coleta sanguínea diferentes, constatando que há relação na contagem de leucócitos com a dosagem do óleo essencial e com o tempo de alimentação, ao verificar que em 4 semanas de alimentação apenas o grupo de peixes alimentados com 5mg do óleos apresentou acréscimos no número de leucócitos e somente na sexta semana que os leucócitos do grupo com a dieta de 10 mg de óleo aumentaram.

Ao se tratar dos resultados obtidos neste presente trabalho, o número de leucócitos e trombócitos diminuíram nas coletas de 24 e 48 horas principalmente para os grupos alimentados com probiótico e óleo de canela, possivelmente como uma forma de resposta à infecção por *Aeromonas hydrophila*, já que de acordo com KANWKANWAL; TAYYEB (2019) a menor contagem de células nas últimas coletas pode ser explicada pela ação dos aditivos alimentares de combater as bactérias nocivas de forma mais eficiente, causando uma demanda baixa e menor de leucócitos, conforme mostrado nos resultados de sua pesquisa. Além disso, o uso antecedente destes aditivos neste presente trabalho podem ter previnido que as bactérias maléficas conseguissem colonizar o trato intestinal do peixes com facilidade, já que, em se tratando de probióticos, a colonização das bactérias probióticas, que são benéficas para o trato gastrointestinal dos peixes, reduz a oportunidade das bactérias patogênicas de se aderirem e colonizarem o sistema gastrointestinal dos peixes, conferindo uma maior capacidade de defesa imunológica e benefícios para à saúde dos animais (ASADUZZAMAN *et al.*, 2018).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO 2

De acordo com os resultados deste capítulo, pode-se afirmar que ambos os aditivos alimentares (probiótico Flora 5 e óleo essencial de canela casca) apresentaram boas respostas na manutenção da saúde das tilápias-do-Nilo ao serem infectados pela bactéria *Aeromonas hydrophila*, em comparação com o tratamento controle, observado através dos parâmetros hematológicos, na presença ou ausência de sinais clínicos de doença, no nível de estresse e no número de células de resposta e defesa do organismo animal (eritrócitos e leucócitos). Na qual o probiótico Flora5 ganhou mais destaque nos testes *in vivo* por desenvolver respostas mais evidentes dos peixes após desafio com a bactéria. Entretanto, a ausência de variações significativas dos parâmetros citados acima na coleta pré-infecção pode representar que os aditivos alimentares não influenciam de forma significativa a fisiologia dos peixes em estado equilibrado de homeostasia e estresse. De acordo com as discussões levantadas, melhores resultados podem ser alcançados com uma exposição mais prolongada desses aditivos alimentares.

## CONCLUSÃO

---

---

Diante das considerações finais do Capítulo 1 e Capítulo 2, pode-se concluir, nesta dissertação, que o óleo essencial de canela casca se sobressaiu em relação ao probiótico Flora 5 na inibição do patógeno *Aeromonas hydrophila* nos testes *in vitro* do Capítulo 1, porém foi ultrapassado pelo probiótico Flora 5, já que este desempenhou melhor papel de agente mantenedor da saúde das tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) frente a infecção experimental. O provável motivo deste padrão pode estar interligado com o fato de que probióticos conseguem interagir melhor com a microbiota intestinal dos peixes. Contudo, o uso de óleos essenciais na alimentação dos peixes também trouxe benefícios para os peixes, principalmente no combate a infecção bacteriana, fato esse observado pela progressão mais contida da doença e pela menor percepção de estresse nos animais deste tratamento ao comparar com tratamento controle. No entanto, esta conclusão pode sofrer interferências de acordo com: a escolha do tempo de exposição dos peixes a esses aditivos, a concentração utilizada, a composição das linhagens e dos compostos ativos e da forma de aplicação destes produtos. Por isso, quando for levar esses aditivos para a cadeia produtiva será necessário elaborar métodos que se apliquem de forma mais prática nas pisciculturas.

Nesta ocasião, pode-se alavancar questionamentos importantes que precisam ser mais estudados como: durabilidade dos aditivos aspergidos na ração, possibilidade de aplicação intercalada entre óleos essenciais e probióticos, já que a aplicação deles ao mesmo tempo não é recomendada devido a influência que um pode provocar no outro em suas atividades e qual parâmetro da fisiologia dos peixes deve ser selecionado para confirmar ação positiva nos peixes em produções intensivas, já que os parâmetros alterados (sinais clínicos, número de células de defesa, hemoglobina e comportamento animal) neste experimento em ambiente controlado do sistema de aquários podem variar em ambiente natural da piscicultura e assim, não serem usados como um padrão imutável para monitorar a sanidade dos peixes.

Por fim, apesar dessas variações, a certeza extraída desta dissertação é a importância de procurar novos métodos para manter e restaurar a saúde dos peixes que não cause resistência a patógenos e prejuízos para o meio ambiente, para os produtores e para os consumidores, consequências negativas já comprovadas pelo uso exacerbado de antibióticos. Dentre estes métodos, nesta dissertação foi listado duas opções (probióticos e óleos essenciais) e que em resumo, podem garantir mais bem estar para os animais, produções mais lucrativas para os piscicultores, sem grandes perdas ou gastos por surtos de doenças, atrelado a boas práticas de produção, além de maior quantidade e qualidade alimentar para os consumidores de pescado.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

ABARIKEA, E.D.; CAIA, J.; LUA, Y.; YUA, H.; CHEND, L.; JIANA, J.; TANGA, J.; JUND, L.; KUEBUTORNYEA, F.K.A. Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, v.82, p.229–238, 2018.

ABATZOPOLULOS T., BEARDMORE J., CLEGG J. and SORGELOOS P. *Artemia*. Basic and applied biology. *Kluwer Academic Publishers*, 2010.

ABEL, P.D. *Water Pollution Biology*. *Ellis Horwood Ltd, Publishers*, Chichester, 1989.

ABOU-EL-ATTA, M.; TAWWAB, A.A.; ABEL-RAZEK, N.; ABDELHAKIM, T.M.N. Effects of dietary probiotic *Lactobacillus plantarum* and whey protein concentrate on the productive parameters, immunity response and susceptibility of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), to *Aeromonas sobria* infection. *Aquaculture Nutrition*, v. 00, p.1–11, 2019.

ABREU, J.S. TAKAHASHI, L.S.; HOSHIBA, MA.; URBINATI, EC. Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 69, n. 2, 2009.

ADDO, S.; CARRIAS, A.A.; WILLIAMS, A.A.; LILES M.R.; TERHUNE, J.S.; DAVIS, D.A. Effects of *Bacillus subtilis* strains and the prebiotic Previda on growth, immune parameters and susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*, p.1–13, 2017.

AFIFI, F.U.; ABU-IRMAILEH, B.E.; ALNOUBANI, R.A. Comparative analysis of the essential oils of *Teucrium polium* L. grown in different arid & semiarid habitats in Jordan. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.2, n.1, p.42-52, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Alimentos*. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em: julho de 2008. IX- Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 02, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, v.09. 2002.

AHMAD, M.H.; MESALLAMY, A.M.D.E.; SAMIR, F.; ZAHRAN, F. Effect of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) on Growth Performance, Feed Utilization, Whole-Body Composition, and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Nile Tilapia. *Journal of Applied Aquaculture*, v.23, p.289–298, 2011.

ALBERT, V; RANSANGAN, J. Antibacterial potential of plant crude extracts against Gram negative fish bacterial pathogens. *Int J Res Pharm Biosci*, v.3, n.2, p. 21-27, 2013.

ALGAMMAL, A.M.; MOHAMED, M.F.; TAWFIEK, B.A.; HOZZEIN, W.N.; KAZAZ, W.M.; MABROK, M. Molecular Typing, Antibigram and PCR-RFLP Based Detection of *Aeromonas hydrophila* Complex Isolated from *Oreochromis niloticus*. *Pathogens*, v.9, v.238, 2020.

ALMEIDA, C.K.L.; LAGE, S.A.G.; OLIVEIRA, C.M.G.; SANTOS, M.; ESPINOLA, M.A.; SANTOS, D.M.d.S. *Aeromonas hydrophila* em diferentes órgãos de Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1785). XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX, 2013.

ALSAID, M.; DAUD, H.; BEJO, S.K.; ABUSELIANA, A. Antimicrobial activities of some culinary spice extracts against *Streptococcus agalactiae* and its prophylactic uses to prevent streptococcal infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, v.2, n.6, p.532-538, 2010.

ALVES, F.C.B. *Ação antibacteriana de associações de antimicrobianos: nisina, óleos essenciais e compostos majoritários*. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

ALY, S.M.; AHMED, H.A.G.; GHAREEB, A.A.A.; MOHAMED, M.F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*, v.25, p.128-136, 2008.

ALY, S.M.; MOHAMED, M.F. *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *The Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v.94, n.5, p.31-39, 2010.

ALY, S.M.; MOHAMED, M.F.; JOHN, G. Effects of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, v. 39, n. 8, p. 828- 836, 2008.

AMER, S.A.; METWALLY, A.E.; AHMED, S.A.A. The influence of dietary supplementation of cinnamaldehyde and thymol on the growth performance, immunity and antioxidant status of monosex Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2018.

AMIR, A.; ZUBERI, A.; KAMRA, M.; IMRA, M.; MURTAZA, M.U.H. Evaluation of commercial application of dietary encapsulated probiotic (*Geotrichum candidum* QAUGC01): Effect on growth and immunological indices of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton 1822) in semi-intensive culture system. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019.

AMIRI, Z.; BAHREKAZEMI, M. Effect of oral administration of Levamisole, Quil -A and Cinnamon in growth amount, hematological and immune parameters of Marmalade cichlid, *Labeotrophus fuelleborni* (Ahl, 1926). *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*, v.3, n.2, p.86 -97, 2017.

ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, L. N.; PROBST, I.S.; FERNANDES JUNIOR, A. Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, n. 26,v.1,p. 34-40. 2014.

ANDRADE, D.R.; YASUI, G.S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, p.166-172, 2003.

ANDRADE, M.A. *Óleos essenciais de Cinnamomum zeylanicum, Cymbopogon nardus e Zingiber officinale: caracterização química, atividade antioxidante e antibacterian*. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ARMSTRONG, S. M., HARGRAVE, B. T. & HAYA, K. Antibiotic Use in Finfish Aquaculture: Modes of Action, Environmental Fate, and Microbial Resistance. *The Handbook of Environmental Chemistry*, v.5, p.341–357, 2005.

ASADUZZAMAN M, SOFIA E, SHAKIL A, HAQUE NF, KHAN MNA, IKEDA D, KINOSHITA S, ABOL-MUNAFI AB. 2018. Host gut-derived probiotic bacteria promote hypertrophic muscle progression and upregulate growth-related gene expression of slow-growing Malaysian Mahseer *Tor tambroides*. *Aquaculture Rep.*, v.9, p.37–45, 2018.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. *Chichester: Ellis Horwood*, 1987.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish. Sixth Edit ed. [s.l.] *Springer Internacional Publishing Switzerland*, 2016.

AZEVEDO, R.V.; FOSSE FILHO, J.C.; PEREIRA, S.L.; ANDRADE, D.R., VIDAL JÚNIOR, M.V. Prebiótico, probiótico e simbiótico para larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphrenemidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 68, n. 3, 2016.

AZEVEDO, R.V.; FOSSE-FILHO, J.C.; CARDOSO, L.D. et al. Economic evaluation of prebiotics, probiotics and symbiotics in juvenile Nile tilapia. *Rev. Ciênc. Agron.*, v.46, p.72-79, 2015.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B.; Uso do Sistema Teste de *Allium cepa* como Bioindicador de Genotoxicidade de Infusões de Plantas Medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BAKKALI, F.S.; AVERBECK, D.; AVERBECK, M.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. *Food and chemical toxicology*, v. 46, p. 446-475, 2008.

BAPTISTA, C., DELLOVA, D., DONATI, G., CEZÁRIO, G., REAL, J. V., LINO, J., ALBUQUERQUE, L., SANTOS, M., OLIVEIRA, M., VIEIRA, R. *Anuário peixe BR da piscicultura*. Assoc. Bras. Da Piscic. 71. 2018.

BASSOLÉ, I. H.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; TIROGO, S.; FRANZ, C.;NOVAK, J.; DICKO, M. H. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*, v. 15, n.11, p.7825-7839. 2010.

BATISTA, J.M.M.; FERREIRA, A.H.C.; DE BRITO, J.M.; JÚNIOR, H.A.d.S. Desempenho produtivo de alevinos de tilápias do Nilo alimentados com ração contendo probiótico. *Rev. Cient. Prod. Anim.*,

v.23, n.1, p.1-4, 2021.

BHARADWAJ, ABRAHAM, T.J. JOARDAR, N.S. 22 Immune effector activities in challenged rohu, *Labeo rohita* after vaccinating with *Aeromonas* bacterin. *Aquaculture*, v.16, n.22, p.392–395, 2013.

BITTENCOURT, N.L.R.; MOLINARI, L.M.; SCOARIS, D.O.; PEDROSO, R.B.; NAKAMURA, C.V.; NAKAMURA, T.U.; ABREU FILHO, B.A.; DIAS FILHO, B.P. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. *Acta Scientiarum*, v.25, p.385-389, 2003.

BOIJINK, C.L.; INOUE, L.A.A.K.; CHAGAS, E.; CHAVES, F.C.M. *Plantas medicinais como imunostimulantes para peixes*. In: SIMPÓSIO SOBRE INOVAÇÃO E CRIATIVIDADE CIENTÍFICA NA EMBRAPA, 2., 2010, Manaus. Anais... Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2010.

BONIN, M.C.B.; PENTEADO, A.L.; QUEIROZ, S.C.N. Avaliação da atividade antagonista de bactérias ácido lácticas e seus metabólitos frente a patógenos de origem animal. *Brazilian Journal of Development*, v.5, n.10, p.18511-18525, 2019.

BORDA, M.R.; FRACALOSSO, D.M.; PEZZATO, L.E.; MENOYO, D.; BAUTISTA, J.M. Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. *Aquatic Living Res.*, v. 16, p. 362-369, 2003.

BOUND, J.P.; KITSOU, K.; VOULVOULIS, N. Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment. *Environment Toxicology and Pharmacology*, v.21, p.301- 307, 2006.

BOURLIOUX, P.B.; KOLETZKO, F.; GUARNER, V.; BRAESCO, V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host. Report in Danone symposium the inteligente intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.78, p.675-683, 2003.

BOUTIN, S.; BERNATCHEZ, L.; AUDET, C.; DERÔME, N. Antagonistic effect to indigenous skin bacteria of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) against *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum*. *Veterinary Microbiology*, v. 155, p. 355-361, 2012.

BOYD, C.E.; QUEIROZ, J. *Feasibility of retention structure, settling basins and Best management*, 2001.

BOZANO, G.L.N. Viabilidade Técnica da Criação de peixes em tanques-redes. In: SIMPÓSIO BRACCINI, G. L.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; FILHO, L. A. & DIGMAYER, M. BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12., 2002, Goiânia. Anais... Goiânia: Abraq., p.107-111, 2002..

BRUGALLI, I.; *Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal*. In: Simpósio sobre manejo e nutrição de aves e suínos, Campinas, Sp, v.1, p.167-182, 2013.

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, n.14,

BURT, S. A.; VAN DER ZEE, R.; KOETS, A. P.; GRAAFF, A. M.; VAN KNAPEN, F.; GAASTRA, W.; VELDHUIZEN, E. J. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, v.73, n.14, p.4484-4490. 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial application in foods – a review. *Internacional jornal of food microbiology*, v. 94, p.223-253, 2004.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 205-210, sept. 2003.

CAÑADA-CAÑADA, F.; MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; ESPINOSA-MANSILLA, A. Analysis of antibiotics in fish samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 395, n.4, p. 987–1008, 2009.

CARRASCHI, S. P.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G.; CASTRO, M. P.; BORTOLUZZI, N. L.; GÍRIO A. C. F.; Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 63, n. 3, p. 579-583, 2011.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*. v.5,p.26-32. 2007.

CASTRO, J.C. Uso de Aditivos e Probióticos em rações animais. I Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestras sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. *Bol. Téc. Inst. Pesca*, v.34, 2003.

CASTRO, R.D. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*. 2010. 170 f.Tese (Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, 2010.

CAVALCANTE, M.F. Síntese de 1,3,5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente *Artemia Salina*. *Química Nova*, v. 23, n.1, 2000.

CAVALCANTE, R.B., TELLI, G.S.; TACHIBANA, L.; DIAS, D.d.C.; OSHIRO, E.; NATORI, M.M.; SILVA, W.F.d. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Nile tilapia: Growth performance and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture Reports*, v.17, 2020.

CHAUDHURY, A.; NATH, G.; SHUKLA, B. N.; SANYAL, S. C. Biochemical characterization, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, [S.l.], v. 44, n. 6, p. 434-437, 1996.

CHEN, H.; HU, X.; CHEN, E.; WU, S.; MCCLEMENTS, D.J.; LIU, S.; LI, B.; LI, Y. Preparation, characterization and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. *Food Hydrickk*, v.61, p.662-671, 2016.

CHEN, S.W.; LIU, C.H.; HU, S.Y. Dietary administration of probiotic *Paenibacillus ehimensis*

- NPUST1 with bacteriocinlike activity improves growth performance and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018.
- CHITMANAT, C; TONGDONMUAN, K; NUNSONG, W. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings.
- CIPRIANO, R. C. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. Washington, D.C.: *Fish and Wildlife Service Division of Fishery Research*, 2001.
- CITARASU, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, v.18, n.3, p.403-414, 2010.
- CNA- CENSO NACIONAL AGROPECUÁRIO, Argentina, 2002.
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). Doenças de animais aquáticos de importância para o Brasil. Disponível em: [www.cnabrazil.org.br/documentos-tecnicos/cartilhas-de-cna-de-sanidade-aquicola](http://www.cnabrazil.org.br/documentos-tecnicos/cartilhas-de-cna-de-sanidade-aquicola). Acesso em: dezembro. 2019.
- CRUZ, P.M.; IBÁÑEZ, A. L.; HERMOSILLO, O.A.M.; SAAD, H. C. R. Use of Probiotics in Aquaculture. *International Scholarly Research Network ISRN Microbiology*, v. 13, 2012.
- CUNHA, P. S. Efeito vasorrelaxante dos isômeros (+) e (-) – Linalol em artéria mesentérica de rato. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2013.
- CYRINO, J.E.P.; BICUDO, A.J.A.; SADO R.Y.; BORGHESI, R.; DAIRIK, J. K. A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, p.68-87, 2010.
- DAHIYA, T; SIHAG, R.C.; GAHLAWAT, S.K. Effect of probiotics on the haematological parameters of Indian Magur (*Clarius batrachus* L.). *J Fish Aquat Sci.*, v.7, p.279–290, 2012.
- DAIRIKI, J.K.; MAJOLO, C.; CHAGAS, F.C.M.; DE OLIVEIRA, M.R.; DE MORAIS, I.S. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. Circular técnica, Embrapa Amazônia Ocidental, 1ºed, 2013.
- DE BRITO, J.M.; FERREIRA, A.H.C.; JÚNIOR, H.A.d.S.; OLIVEIRA, A.P.A.; SANTOS, C.H.L.M.; OLIVEIRA, L.T.S. DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO (*oreochromis niloticus*) ALIMENTADOS COM CEPAS PROBIÓTICAS E SUBMETIDOS A DESAFIO SANITÁRIO. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.20, 1-9, e-37348, 2019.
- DE CASTRO, V.S.; XAVIER, D.T.O.; SILVA, A.F.C.d.; FONSECA, J.R.S.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A.; SIGNOR, A. SIGNOR, A.A. Probióticos do gênero *Bacillus* em dietas para pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Research, Society and Development*, v. 10, n. 7, 2021.
- DEDI, J.; HUTAMA, A.A.; NURHAYATI, T.; WASJAN, A.V. Growth performance and flesh quality of common carp, *Cyprinus carpio* feeding on the diet supplemented with cinnamon (*Cinnamomum*

burmannii) leaf. *AACL Bioflux*, 2016, Volume 9, Issue 5.

DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. *Cercla*, n.8, p.38-43, 1997.

DHANAPAKIAM, P.; JOSEPH, J.M.; RAMASWAMY, V.K.; MOORTHY, M.; KUMAR, A.S. The cholesterol lowering property of coriander seeds (*Coriandrum sativum*): mechanism of action. *J Environ Biol.*, v.29, n.1, p.53-56, 2008.

DHANASEKARAN, D.; SUBHASISH, S.; THAJUDDIN, N.; RAJALAKSHNI, M.; PANNEERSELVAM, A. *Journal of Coastal Development*, v.13, n.2, p.103-112, 2010.

DHARA, K.; SAHA, N.C.; MAITI, A.K. Studies on acute and chronic toxicity of cádmium to freshwater snail *Lymnaea acuminata* (Lamarck) with special reference to behavioral and hematological changes. *Environmental Science and Pollution Research*, v.24, n.35, p.27326-27333, 2017.

DIAS, D.d.C.; TACHIBANA, L.; IWASHITA, M.K.P.; NAKANDAKARE, I.B.; ROMAGOSA, E.; SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Probiotic supplementation causes hematological changes and improves non-specific immunity in *Brycon amazonicus*.

DIAS, M. K. R.; YOSHIOKA, E. T. O.; RODRIGUEZ, A. F. R.; RIBEIRO, R. A.; FARIAS, F. S. E. D. V.; OZÓRIO, R. O. A.; TAVARES-DIAS, M. Growth, physiological and immune responses of *Arapaima gigas* (Arapaimidae) to *Aeromonas hydrophila* challenge and handling stress following feeding with immunostimulant supplemented diets. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 84, p. 843–847, Jan. 2019.

DOMINGUES, A.F. *Estudo da aplicação de probióticos na aquacultura de linguado senegalês* (*Solea senegalensis* Kaup, 2858). 2014. Dissertação (Grau de Mestrado em Aquacultura), Instituto Politécnico de Leiria, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Peniche, 2014.

EL-NABY, A.S.A.; AL-SAGHEER, A.A.; NEGM, S.S.; NAIEL, M.A.E. Dietary combination of chitosan nanoparticle and thymol affects feed utilization, digestive enzymes, antioxidant status, and intestinal morphology of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 2019.

EMBRAPA. *Pesca e aquicultura*. Palmas: Embrapa, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/>>. Acesso em: abr. 2017.

EPA- *Environment Protection Authority* (EPA). State of the Environment, 2006

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Fisheries and Aquaculture Department*, Rome, 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i2727e.pdf>. Acesso em 15 abr. 2020.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Fisheries and Aquaculture Department*, Rome, 2018.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Fisheries and Aquaculture Department*, Rome, 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i2727e.pdf>. Acesso em 15 abr. 2020.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Global aquaculture production statistics*.

Rome: FAO, 2009. 180 p.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Global aquaculture production statistics. Rome: FAO, 2016. 194 p.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. State of The World Fisheries and Aquaculture: Sustainability in action. Rome: FAO, 2020. 244 p.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2018. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. p. 204-215, 2018.

FAO/OIE/WHO - 1st Expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment. *Geneva, Switzerland*, p.1-5. December, 2003.

FARAMARZI, M.; KIAALVANDI, S.; LASHKARBOLOOKI, M.; IRANSHAI, F. The investigation of *Lactobacillus acidophilus* as Probiotics on Growth Performance and Disease Resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Americam- Eurasiam Journal of Science Research*, v. 6, n. 1, p. 32-38, 2011.

FERNANDES JÚNIOR, A.; SILVA, G. S.; BARBOSA, L. N.; ALVES, F. C. B.; ANDRADE, B. F. M. T.; ALBANO, M.; DI STASI, L. C. Medicinal Plants from the Brazilian Savanna with Antibacterial Properties. *European Journal of Medicinal Plants*, v. 4, p.1-13. 2014.

FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G. & PEDRO, L.G. 2007. Plantas Aromáticas e Medicinais. Fatores que afectam a produção. pp. 1-18. In: Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (Eds), *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático, 3.<sup>a</sup> Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

FIGUEIREDO, H. P. C. et al. *Streptococcus agalactiae* associado a meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, p. 678-680, 2006.

FIGUERAS, M.J. et al. ‘*Aeromonas intestinalis*’ and ‘*Aeromonas enterica*’ isolated from human faeces, ‘*Aeromonas crassostreae*’ from oyster and ‘*Aeromonas aquatilis*’ isolated from lake water represent novel species. *New Microbes New Infections*. p. 4-76. jan. 2017.

FLORES-MEIRELES, A.L.; WALKER, J.N.; CAPARON, M.; HULTGREN, S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Rev Microbiol*, v.13, n.5, p.269-284, 2015. FRASCÁ-SCORVO, C.M.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B. Comportamento alimentar do matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. *Bol. Inst. Pesca*, v. 27, p. 1-5, 2001.

FRANCO, A. L. P.; OLIVEIRA, T. B.; FERRI, P. H.; BARA, M. T. F.; DE PAULA, J. R. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies &

Hook) Tronc. (ALFAZEMA), Ocimum gratissimum L. (ALFAVACACRAVO) E Curcuma longa L. (AÇAFRÃO). *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.4, n.2. Goiás, 2007.

FRASCÁ-SCORVO, C.M.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B. Comportamento alimentar do matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. *Bol. Inst. Pesca*, v. 27, p. 1-5, 2001.

FRECCIA, A. et al. Essential oils in the initial phase of broodstock diets of Nile tilapia. *Brazilian Journal of Animal Science*, v.35, n.4, p.669-676, 2009.

FREITAS, P.T.F. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil-uma revisão. *Revista de Ciências Veterinárias e Saúde Pública*, v.3, n.1, p.44-59, 2016

FULLER, R. Probiotics in man and animals: A review. *Journal of Applied Bacteriology*, v.66, p.365-378, 1989.

FURLAN, R.L. *Avaliação e uso de pré e probióticos*. Anais Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó, p.58-74, 2005.

GALLI, L.F.; TORLONI, C.E.C. Criação de peixes. São Paulo: Nobel. 1984. 2. ed. 119 p. FERREIRA, R.M.A.; GONTIJO, V. de P.M. Fertilização de viveiros de tilapia com adubo orgânico [suíno]. Informe Agropecuário - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. ISSN 0100-3364, v.10, p.12-16, 1984.

GARLET, T.M.B.; SANTOS, O.S.; MEDEIROS, S.L.P.; MANFRON, P.A.; GARCIA, D.C.; BORCIONI, E. Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. *Cien. Rural.*, v.37, n.4, p.956-962, 2007.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic outline of the procaryotes. In: Bergey's manual of systematic bacteriology (2nd ed., Release 5.0), New York: Springer, 2004

GAYED, M.A.; ELABD, H.; TAGELDIN, M.; ABBASS, A. Probiotic Zado® (*Ruminococcus Flavefaciens*) boosts hematology, immune, serum proteins, and growth profiles in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology Reports*, v.2, 2021.

GAZERANI, F.M. Evaluation of some hematological parameters in some species of Acipenseridae. *Journal of Animal Biology*, v.2, n.1, p.12-23, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v.30, p. 374-381. 2007.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly (DL-lactide-coglycolide) (PGLA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. *Journal of Food Science*, v.76, p.16-24, 2011.

GOMES, P.R.B.; REIS, J.B.; SILVA, J.C.; OLIVEIRA, R.W.S.; PAULA, M.L.; LOUZEIRO, H.C.; FILHO, V.E.M.; FONTENELE, M.A. Avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*. *Ver. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, v.48, n.1, p.112-127, 2019.

GONÇALVES, A.T.; MAITA, M.; FUTAMI, K. ENDO, M.; KATAGIRI, T. Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Sci.*, v.77, p.633-642, 2011.

GONÇALVES, S.M.L. *Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional e do ambiente fabril*. 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

GOÑI, P. et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, v. 116, n. 04, p. 982-989, 2009.

GUPTA V.; GARG R. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v.27, p. 202-209, 2009.

GUTIÉRREZ RAMÍREZ, L.; MONTOYA CAM-PUZANO, O.; RUIZ VILLADIEGO, S. Evaluación del potencial Bactericida de los extractos de Bacterias Acido Lácticas Sobre el crecimiento In Vitro de *E.coli*, *Salmonella* sp y *Listeria monocytogenes*. *CENIC Ciencias Biol.*, v.36, p.1-6, 2005.

HABIBA, M.M.; HUSSEIN, E.E.; ASHRY, A.M.; EL-ZAYAT, A.M.; HASSAN, A.M.; EL-SHEHAWI, A.M.; SEWILAM, H.; DOAN, H.V.; DAWOOD, M.A.O. Dietary Cinnamon Successfully Enhanced the Growth Performance, Growth Hormone, Antibacterial Capacity, and Immunity of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Animals*, v.11, n. 2128, 2021.

HADIAN, J., GHASEMNEZHAD, M., RANJBAR, H. Antifungal potency of some essential oils in control of postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*. *Journal of Essential Oil Research*. v. 11, p. 553–562, 2008.

HARDARI, A; NOBAKHT, A; SAFAMEHR, A. Investigation the effects using Nettle (*Urtica dioica*), *Menta pulagum* (*Oreganum vulgare*) and *Zizaphora* (*Thymus vulgaris*) medicinal plants and there mixtures on biochemical and immunity parameters of broilers. Proc. 4 th Iran. Cong Animal Science, p. 214-217, 2010.

HARIKRISHNAN, R. et al. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, v.317, p.1-15, 2011.

HARIKRISHNAN, R.; DEVI, G.; BALASUNDARAM, C.; DOAN, H.V.; JATURASITHA, S.; SARAVANAN, K., RINGO, E. Impact of cinnamaldehyde on innate immunity and immune gene expression in *Channa striatus* against *Aphanomyces invadans*. *Fish and Shellfish Immunology*, v.117, p.1–16, 2021.

HARIKRISHNAN, R.; MOON, Y.-G.; KIM, M.-C.; KIM, J.-S.; HEO, M.-S.; BALASUNDARAM, C.; DHARANEEDHARAN, S. Phytotherapy of *Aeromonas hydrophila*-infected goldfish, *Carassius auratus*. *J. World Aquac. Soc.*, v.41, p.391–401, 2010.

HARIKRISHNAN, R; BALASUNDARAM, C; HEO, M.S. Supplementation diet containing probiotics, herbal and azadirachtin on hematological and biochemical changes in *Cirrhina mrigala* against

*Aphanomyces invadans*. *Fish Aquacult J*, v.4, p.1–11, 2010.

HASHEMI, S.R.; DAVOODI, H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary Research Communications*, v.35, n.2, p.169-180, 2011.

HIRANSUTHIKUL, N.; TANTISIRIWAT, W.; LERTUTSAHAKUL, K.; VIBHAGOOOL, A.; BOONMA, P. Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in southern Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, v.41, n.10, p.93-96, 2005.

HOLLIMAN, A. The veterinary approach to trout. In: BROWN, L. (Ed.). *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*. Oxford: Pergamon Press, Cap. 14, p. 223-247, 1993.

HOSEINIFAR, S.H.; SUN, Y.H; WANG, A.; ZHOU, Z. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, A Review of current knowledge and future perspectives. *Fronties in Microbiology*, v. 9, 2018.

HOWARD, S.P.; BUCKLEY, J.T. Activation of the hole-forming toxin-related factor in cultures of *Aeromonas* species by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infection and Immunity*, v.50, p.322-323, 1985.

HUANG, Z.; LIU, X.; JIA, S.; LUO, Y. Antimicrobial effects of cinnamon bark oil on microbial composition and quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during chilled storage. *Food Control*, v.82, p.316- 324, 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2019). Produção da Pecuária Municipal 2018. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2018\\_v46\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf). Acesso em: 14/12/2019.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2019a). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017- 2018 – POF (Dados preliminares). Rio de Janeiro.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2019b). Censo agropecuário 2017. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro\\_2017\\_resultados\\_definitivos.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro_2017_resultados_definitivos.pdf). Acesso em: 07/05/2020.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2020). Estatísticas sociais – estimativas de população Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao.html>. Acesso em: 08/04/2020

IBGE/PPM. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: [https://www.ibge.gov.br/media/com\\_materialdeapoio/arquivos/ea77821e06cad1457f9b35c1abe2137f.pdf](https://www.ibge.gov.br/media/com_materialdeapoio/arquivos/ea77821e06cad1457f9b35c1abe2137f.pdf). Acesso em: 28 abril. 2020

IBGE/PPM. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2017\\_v45\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf) Acesso em: 28 abril. 2020

IBGE/PPM. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2018\\_v46\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf). Acesso em: 28 abril. 2020

ISHIKAWA, N.M.; RANZAVI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V. Metodologia para a quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. *Archives of Veterinary Science*, v. 13, n. 1, p. 54-63, 2008.

ITSARANUWAT, P.; SHAL-HADDAD, K.; ROBINSON, R.K. The potential therapeutic benefits of consuming ‘health-promoting’ fermented dairy products: a brief update. *International Journal of Dairy Technology*, v. 56, n. 4, p. 203-210, 2003.

JAIN, N.; MEHTA, A. BHARTI, V. Screening, characterization, and in vitro evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v.10, n.8, p.288-293, 2017.

JANSEN, A. M.; CHEFFER, J. J. C.; SVENDSEN, A. B. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of test methods. *Planta Med.*, New York, v. 53, n. 5, p. 395-398, 1987.

JANTAN, I.; YEOH, E.L.; SURIANI, R.; NOORSIHA, A.; ABU SAID, A. A comparative study of the constituents of the essential oils of three *Cinnamomum* species from Malaysia. *Journal of Essential Oil Research*, v.15, p.387-391, 2003.

JANTAN, I.B.; MOHARAM, B.A.K.; SANTHANAM, J.; JAMAL, J.A. Correlation between chemical composition and antifungal activity of the essential oils of eight *Cinnamomum* species. *Pharmaceutical Biology*, v.46, n.6, p.405-412, 2008.

JATOBÁ, A.; DO NASCIMENTO VIEIRA, F.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JERÔNIMO, G. T.; MARTINS, M. L. Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.9, p.1201-1207, 2008.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.d.N; NETO, C.B.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M.L. Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.43, n.9, p.1201-1207, set. 2008.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; PAULA, A. T. , SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; PENNA, A. L. B. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo Mozzarella cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.v.6, p. 141–156, 2014.

JOLY, A.B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal, São Paulo: Nacional, 2002.

KAORI, V. Coentro: o que é, benefícios e malefícios, para que serve e muito mais. *Portal Vida Livre*, 2021

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.*, v. 8, p. 1-13, 2008.

- KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.*, v. 8, p. 1-13, 2008.
- KOTZENT, S. *Bactérias com potencial probiótico do intestino de tambaqui (Colossoma macropomum)*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Câmpus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 2017.
- KIM, B.H.; LEE, Y.G.; LEE, J.Y. CHO, J.Y. Regulatory effect of cinnamaldehyde on monocyte/macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators of inflammation*, 2010.
- KIM, F.J.P.; SILVA, A.E.M.; SILVA, R.V.S.; KIM, P.C.P.; ACOSTA, A.C.; SILVA, S.M.B.C.; SENA, M.J.; MOTA, R.A. Elevada frequência de *Aeromonas* spp. e genes de virulência em cultivos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede, na região semiárida de Pernambuco, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.71, n.5, p.1609-1615, 2019.
- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Ver.*, v.12, p.39-86, 1993.
- KOLIDA, S.; GIBSON, Glenn R. Prebiotic Capacity of Inulin-Type Fructans. *The Journal of Nutrition*. Bethesda, v. 137, n. 11, p. 2503-2506, nov. 2007.
- KONDERA, E.; BOJARSKI, B.; LUGOWSKA, K.; KOT, B.; WITESKA, M. Hematological and Hematopoietic Effects of Bactericidal Doses of Trans-Cinnamaldehyde and Thyme Oil on *Cyprinus carpio* Juveniles. *Frontiers in Physiology*, v.12, 2021.
- KOZINSKA, A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *Journal of Fish Diseases*, v. 30, p. 293-301, 2007.
- KUBITZA, F.; ONO, E. A.; CAMPOS, J. L. Os caminhos da produção de peixes nativos no Brasil: uma análise da produção e obstáculos da piscicultura. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v. 5, n. 7, p. 14-23, jul./ago. 2012.
- KUBITZA, F.; ONO, E.A. Piscicultura familiar como ferramenta para o desenvolvimento e segurança alimentar no meio rural. *Panor. Aquic.*, v.20, p.14-23, 2010.
- KUEBUTORNYE, F.K.A.; WANG, Z.; LU, Y.; ABARIKE, E.D.; SAKYI, M.E.; LI, Y.; XIE, C.X.; HLORDZIH, V. Effects of three host-associated *Bacillus* species on mucosal immunity and gut health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, v.97, p.83–95, 2020.
- KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere, Freiburg*, n.75, v.4, p.417-434, 2009.
- LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; GUZMÁN-MÉNDEZ, B.E.; LÓPEZMADRID, W. Use of the bacterias *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquacult.*, n. 216, p. 193-201, 2003.
- LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A. Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture.

*Aquaculture*, v. 424-425, p. 53-62, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.040>.

LEIRA, M.H.; LAGO, A.A.; BOTELHO, H.A.; MELO, C.C.V.; MEDONÇA, F.G.; NASCIMENTO, A.F.; FREITAS, R.T.F. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil – uma revisão. *Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.*, v.3, n.1, p.44-59, 2016.

LESTON, S.; NUNES, M.; LEMOS, M.F.L.; JORGE, G.; PARDAL, M.Â.; RAMOS, F. The veterinary drug use and environmental. In: BORGEOARS; EDITOR. *Animal Feed: Types, nutrition and safety*. Nova Science Publishers, Inc.; p.61–83, 2011.

LESTON, S.; NUNES, M.; LEMOS, M.F.L.; JORGE, G.; PARDAL, M.Â.; RAMOS, F. The veterinary drug use and environmental. In: BORGEOARS; EDITOR. *Animal Feed: Types, nutrition and safety*. Nova Science Publishers, Inc.; p.61–83, 2011.

LETHBRIDGE, A.B. Natural rumen proteins of weapon against antibiotic resistance. Lethbridge Research Centre Advance, 20, Canadá: *Agriculture*, 2002. Disponível em: <<http://www>. Acesso em: 21 nov. 2019.

LI, J.; TAN, B.; MAI, K.; AI, Q.; ZHANG, W.; XU, W.; LIUFU, Z.; MA, H. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. *Aquaculture*, v.253, p.140-147, 2006.

LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L.; SANTOS B.H.C. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais. *Rev. Bras. Cienc. Saúde*, v.7, p.251-258, 2006.

LIMA, I.O. OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O., FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Ver. Bras. Farmacogn*, v.20, n.1, p.58-61, 2006.

LIMA, J.S.S et al. Desempenho agroeconômico de coentro em função de espaçamentos e em dois cultivos. *Revista Ciência Agronômica*, v.38, n.4, p.407-413, 2007.

LIU, Y.; GAO, B.; YUE, Q.; GUAN, Y.; WANG, Y.; HUANG, L. Influences of two antibiotic contaminants on the production, release and toxicity of microcystins. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 77: p. 79–87, 2012

LOVSHIN, L. L. Tilapia culture in Brazil. In: COSTAPIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. (Ed.). *Tilapia aquaculture in the Americas*. Louisiana: *The World Aquaculture Society*, 2000. v. 2, p. 133-140

LOVSHIN, L.L. *Red tilapia or Nile tilapia: which is the best culture fish?* In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2, Piracicaba, 1998. *Anais...* Piracicaba: CBNA, 1998. p.179-1998.

MAGNADOTTIR, B. Immunological Control of Fish Diseases. *Marine Biotechnology*, v. 12, p. 361-379, 2010.

MAKLED, S.O.; HAMDAN, A.M.; EL-SAYED, A.F.M. Growth Promotion and Immune Stimulation in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fingerlings Following Dietary Administration of a Novel Marine

Probiotic, *Psychrobacter maritimus* S. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019.

MARCOS, E.; CASTILLO, F.A.; DIMITROV, S.T.; GOMBOSSY DE MELO, B.D.; DE SOUZA, R.P. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, v.32, p.134-142, 2013.

MARINO, L.; LILIENFELD, S.O.; MALAMUD, R.; NOBIS, N.; BROGLIO, R. Do Zoos and Aquariums Promote Attitude Change in Visitors? A Critical Evaluation of the American Zoo and Aquarium Study. *Society and Animals*, v. 18, p. 126-138, 2010.

MÁRQUEZ, I.; GARCÍA-VAZQUEZ, E.; BORRELL, Y.J. Possible effects of vaccination and environmental changes on the presence of disease in northern Spanish fish farms. *Aquaculture*, v. 431, p. 118-123, 2014.

MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J.L.P.; AMARAL, G.V.; VIEIRA, F.N.; DOTTA, G.; JATOBÁ, A.M.B.; PEDROTTI, F.S.; JERÔNIMO, G.T.; BUGLIONE-NETO, C.C.; PEREIRA-JR., G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Braz. J. Biol.*, v. 68, n. 3, p. 657-661, 2008.

MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J.L.P.; AMARAL, G.V.; VIEIRA, F.N.; DOTTA, G.; JATOBÁ, A.M.B.; PEDROTTI, F.S.; JERÔNIMO, G.T.; BUGLIONE-NETO, C.C.; PEREIRA-JR., G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Braz. J. Biol.*, v. 68, n. 3, p. 657-661, 2008. MARTINS, M.L. Manejo Sanitário na Piscicultura. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.; DE LOS, A.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*, Editora Varela, p. 321-330, 2004.

MARTINS, M.L. Manejo Sanitário na Piscicultura. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.; DE LOS, A.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*, Editora Varela, p. 321-330, 2004.

MEHDINEJAD, N.; IMANPOUR, M.R.; JAFARI, V. Combined or Individual Effects of Dietary Probiotic *Pedococcus acidilactici* and Nucleotide on Growth Performance, Intestinal Microbiota, Hemato-biochemical Parameters, and Innate Immune Response in Goldfish (*Carassius auratus*). *Probiotics & Antimicro. Prot.*, 2017.

MEIDONG, R.; DOOLGINDACHBAPORN, S.; SAKAI, K.; TONGPIM, S. Isolation and selection of lactic acid bacteria from Thai indigenous fermented foods for use as probiotics in tilapia fish *Oreochromis niloticus*. *AACL Bioflux*, V.10, n.2, 2017.

MELLO, H.; MORAES, J.R.E.; NIZA, I.G.; MORAES, F.R.; OZÓRIO, R.O.A.; SHIMADA, M.T.; ENGRACIA-FILHO, J.R.; CLAUDIANO, G.S. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 33, p. 724730, 2013.

MENDANHA, R. Entenda os benefícios da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) para a sua saúde. Bem Estar & Alimentação, 2017.

MERCANTE, C.T.J.; CABIANCA, M.A.; SILVA, V.; COSTA, S.V.; ESTEVES, K.E. Water quality in

fee-fishing ponds located in the São Paulo metropolitan region, Brazil: analysis of the eutrophication process. *Acta Limnologica Brasiliensia*, Botucatu, v. 16, n. 1, p. 95-102, 2004.

MHANTY, D.; SAINI, M.R.; MOHAPATRA, S. In vitro study of bioactive antimicrobial compounds from dairy products by certain promising probiotic *Lactobacillus* strains. *Internacional Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.9, n.4, 2017.

MICHELS, I.; PROCHMANN, A.M. Piscicultura. 8. ed. Campo Grande: Editora UFMD, 2003. 177p.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA - MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília, DF. 2013

MOHAMMAD, M.A. Effect of adding different levels of cinnamon (*Cinnamomum* sp) on growth and chemical composition criteria of common carp *Cyprinus carpio* L. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, v. 35, n.1, p.93-98, 2021

MOHAMMADIAN, T.; DEZFULY, Z.T.; MOTLAGH, R.G.; JAGARAN-NEJAD, A.; HOSSEINI, S.S.; KHAJ, H.; ALIJANI, N. Effect of Encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* on Innate Immune System and Hematological Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Post-Administration of Pb. Probiotics and Antimicrobial Proteins. *Springer Science + Business Media*, 2019.

MOREIRA, L. A. O. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* Leach de extratos de duas espécies da família melastomataceae. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em química) – Instituto federal de educação, ciência e tecnologia de Goiás, Anápolis. 2013.

MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; DA SILVA, B. C.; VIEIRA, F. N. Utilização de probióticos na aquicultura. *Panorama da Aquicultura*, Santa Catarina, v.20, n.117, p.52-59, 2010.

MOURIÑO, J.L.P.; NASCIMENTO VIEIRA, F.; JATOBÁ, A.B.; DA SILVA, B.C.; JESUS, G.F.A.; SEIFFERT, W.Q.; MARTINS, M.L. Effect of dietary supplementation of inulin and W. cibaria on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Aquaculture Nutrition*, v.18, p.73-80, 2012.

MOUSTAFA, E.M.; FARRAG, F.A.; DAWOOD, M.A.O.; SHAHIN, K.; HAMZA, A.; DECAMP, O.; MOHAMED, R.; ELSABAGH, M.; ELTHOLTH, M.; OMAR, A.A. Efficacy of *Bacillus* probiotic mixture on the immunological responses and histopathological changes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) challenged with *Streptococcus iniae*. *Aquaculture Research.*, v. 52, 2021.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA - MPA. Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira, 2015. Brasília, DF. 2020. Disponível em: [http://seafoodbrasil.com.br/wpcontent/uploads/2015/09/Plano\\_de\\_Desenvolvimento\\_da\\_Aquicultura-2015-2020.pdf](http://seafoodbrasil.com.br/wpcontent/uploads/2015/09/Plano_de_Desenvolvimento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf). Acesso em: 25/10/2020.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura*, 60 p. 2011

MUÑOZ, A.P.; FLORES, R.V.; RODRIGUES, A.P.O.; MATAVELI, M. Aquicultura: atividade em

ascensão, Ano 1 - Edição 1 - Junho de 2015

MUÑOZ, J.; GÓMEZ, A.; GREEN, A.; FIGUEROLA, J.; AMAT, F.; RICO, C. Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca). *Molecular Ecology*, v.17, p. 3160–3177, 2008.

NAKANDAKARE, I.B.; IWASHITA, M.K.P.; DIAS, D.d.C.; TACHIBANA, L.; RANZANIPAIVA, M.J.T.; ROMAGOSA, E. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias-do-nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 121-135, 2013.

NAKANDAKARE, I.B.; IWASHITA, M.K.P.; DIAS, D.d.C.; TACHIBANA, L.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ROMAGOSA, E. INCORPORAÇÃO DE PROBIÓTICOS NA DIETA PARA JUVENIS DE TILÁPIAS-DONILO: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS. *Bol. Inst. Pesca*, v.39, n.2, p.121 – 135, 2013.

NALIATO, R.F.; CARVALHO, P.L.P.F.; VICENTE, I.S.T.; XAVIER, W.d.S.; GUIMARÃES, M.G.; RODRIGUES, E.J.D.; ITO, P.I.; SARTORI, M.M.P.; BONFIM, F.P.G.; ORSI, R.d.O.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M. Ginger (*Zingiber officinale*) powder improves growth performance and immune response but shows limited antioxidant capacity for Nile tilapia infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Nutrition*, v.00, p.1–15, 2021.

NAYAK, S.K. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, v.29, p.2-14, 2010.

NGUGI, C.C.; OYOO-OKOTH, E.; MUNGO-BUNDI, J.; ORINA, P.S.; CHEMOIWA, E.J.; ALOO, P.A. Effects of dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*) on the growth performance, biochemical, hematological and immunological parameters in juvenile and adult Victoria Labeo (*Labeo victorianus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos. Moduladores do ecossistema digestivo. *Revista Ciência Hoje*, v.28, p.34-38, 2000.

NOGA, E. J. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Second Edi ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2010.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; DOS SANTOS, L.R. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*, 2009.

OLIVEIRA, C.P.F. Efeito de dois metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – Am. Sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus – Amazonas. 67p, 2003.

OLIVEIRA, E.G.; SANTOS, F.J.S.; PEREIRA, A.M.L. E LIMA, C.B. Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria. *Circular Técnica*, vol. 45, n. 12, p. 1-12, 2007.

OLIVEIRA, R.A.; KOMESU, A.; ROSSELL, C.E.V.; FILHO, R.M. Challenges and opportunities in

lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. *Biochemical Engineering Journal* v.133, n.15 p. 219-239, Maio 2018a.

OLIVEIRA, R.C. O panorama da aquíicultura no brasil: a prática com foco na sustentabilidade. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v.2, n.1, p.71-89, 2009.

ONILUDE, A.A.; FAGADE, O.E.; BELLO, M.M.; FADAHUNSI, I.F. Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. *Afr J Biotechnol*, v.4, n.12, p.1404-1408, 2005.

ONU BRASIL - UNITED NATIONS. Sustainable Development Goal. New York: United Nations, 2016.

OPIYO, M.A.; JUMBE, J.; NGUGI, C.C.; CHARO-KARISA, H. Different levels of probiotics affect growth, survival and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in low input ponds. *Scientific African*, v.4, 2019.

OUMZIL, H.; GHOULAMI, S.; RHAJAOUI, M.; ILIDRISSI, A.; FKI-H-TETOUANI, S.; FAID, M.; BENJOUAD, A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytotherapy Research*, v.16, n.8, p.727-731, 2002.

PANNU, R.; DAHYA, S.; SABHLOK, V.P.; KUMAR, D.; SARSAR, V.; GAHLAWAT, S.K. Effect of probiotics, antibiotics and herbal extracts against fish bacterial pathogens. *Ecotoxicol. Environ. Contam.*, v.9, n.1, p.13-20, 2014.

PANORÂMA DA AQUICULTURA. Aspectos relevantes da biologia e do cultivo das tilápias. *Panorâma da Aquicultura*, Rio de Janeiro. v. 5, n. 27, 1995, p. 8 - 13.

PARASA, L.S.; TUMATI, S.R.; PRASAD, C.; KUMAR, C.A. In vitro antibacterial activity of culinary spices aniseed, star anise and cinnamon against bacterial pathogens of fish. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.4, n.3, p.667-670, 2012.

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

PEIXE BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2020. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura, 2020.

PEIXE BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2021. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura, 2021.

PEIXE BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2022. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura, 2022.

PEIXOTO, L.J.S.; SÁ, M.C.A.; GORDIANO, L.A.; COSTA, M.M. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.79, n.3, p.453-461, 2012.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. Nutrição de peixes no Brasil. In: Palestra I Simpósio de Nutrição e

Saúde de Peixes, 2005, Botucatu. Anais. Botucatu: AQUANUTRI, 2005.

PICCOLO, G.; BOVERA, F.; LOMBARDI, P.; MASTELLONE, V.; NIZZA, S.; DI MEO, C.; NIZZA, A. Effect of *Lactobacillus plantarum* on growth performance and hematological traits of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture international*, v.23, n.4, p.1025-1103, 2015

PICKLER, E.; FILHO, V.; RIBEIRO, J.E. Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), Brasília, No. 2328, 2017.

PILARSKI, F.; ROSSINI, A.J.; CECCARELLI, P.S. Isolation, characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Braz J Biol.*, v.68, p.409–414. 2008.

PIZAIA, M.G.; CAMARA, M.R.G.; SANTANA, M.A.; ALVES, R. A piscicultura no brasil: um estudo sobre a produção e comercialização de “*Oreochromis niloticus*”. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Rio Branco – Acre, 20 a 23 de julho de 2008.

PLUMB, J. A. *Edwardsiella Septicaemias*. In: WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. *Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial e Fungal Infections*. New York: CABI Publishing, p.479-493, 1999.

POPMA, J. T.; LOVSHIN, L. L. Worldwide prospects for commercial production of Tilapia. *Research and Development Series*, Aurburn, v. 41, p. 15-17, 1996.

POPMA, T. J.; PHELPS, R. P. Status report to commercial tilapia producers on monosex fingerling production techniques. In: AQUICULTURA BRASIL '98, 1998, Recife. Anais... Recife: SIMBRAQ, 1998. p. 127-145.

POPMA, T.J.; LOVSHIN, L.L. Tilápia especial. *Panorama da Aquicultura*, v.5, n.27, p.7-13, 1995.

POST, G. Fish health. [S.l.]: T.F.H. Publications, p. 37-41, 1987.

R.W. BUSSMANN, G. MALCA-GARCÍA, A. GLENN, D. SHARON, G. CHAIT, D. DÍAZ, K. POURMAND, B. JONAT, S. SOMOGY, G. GUARDADO, C. AGUIRRE, R. CHAN, K. MEYER, A. KUHLMAN, A. TOWNESMITH, J. EFFIO-CARBAJAL, F. FRÍAS-FERNANDEZ AND M. BENITO. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal Ethnopharmacology*, 132, 101–108 (2010).

RASHIDIAN, G.; BOLDAJI, J.T.; RAINIS, S.; PROKI, M.D.; FAGGIO, C. Oregano (*Origanum vulgare*) Extract Enhances Zebrafish (*Danio rerio*) Growth Performance, Serum and Mucus Innate Immune Responses and Resistance against *Aeromonas hydrophila* Challenge. *Animals*, v.11, n.299, 2021.

RASMUSSEN-IVEY, C.R.; FIGUERAS, M.J.; MCGAREY, D. et al. Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: in the wake of reclassification. *Front. Microbiol.*, v.7, p.1-10, 2016.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Sci*, v.76,

p.287–293, 2010.

RAVARDSHIRI, M.; BAHRAM, S.; JAVADIAN, S.R.; BAHREKAZEMI, M. Cinnamon Promotes Growth Performance, Digestive Enzyme, Blood Parameters, and Antioxidant Activity of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Low-Carbohydrate Diets. *Turk. J. Fish. & Aquat. Sci.*, v.21, n.7, p. 309-322.

REIS, J.B. *Estudo analítico, avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial Cinnamomum zeylanicum Blume (canela) frente ao caramujo Biomphalaria glabrata*. Dissertação (Mestrado em Química), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

REZENDE, R.A.E.d.; SOARES, M.P.; SAMPAIO, F.G.; CARDOSO, I.L.; ISHIKAWA, M.M.; DALLAGO, B.E.L.; RANTIN, F.T.; DUARTE, M.C.T. Phytochemicals blend as a dietary supplement for Nile tilapia health improvement. *Fish and Shellfish Immunology*, v.114, p.293–300, 2021.

RIBEIRO, P.A.P.; COSTA, L.S.; LOGATO, P.V.R. Probióticos na aquicultura. *Revista electronica Nutritime*, v, 6, n. 1, p. 837-846, 2008.

RIBEIRO, P.A.P.; COSTA, L.S.; ROSA, P.V.e. Manejo alimentar em piscicultura convencional. *Revista electronica Nutritime*, v. 07, n. 02, p. 1189-1196, 2010.

RICO, A.; VAN DEN BRINK, P.J. Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. *Sci Total Environ*, v.468, p.630-641, 2014.

RINGO, E.; OLSEN, R. E.; GIFSTAD, T. O.; DALMO, R. A.; AMLUND, H., HEMRE, G. I.; BAKKE, A. M. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, v. 16, n. 2, p. 117-136, 2010.

RINGOT, D.; LERZY, B.; CHAPLAIN, K.; BONHOURE, J.; AUCLAIR, E.; LARONDELLE, Y. In vitro adsorption of ochratoxin A on the yeast industry by products: Comparison of isotherm models. *Bioresource Technology*, v.98, p.1812–1821, 2007.

RIVERA-TAPIA, J. A. Antibiotic resistance, public health problem. *Anales Medicos Hospital ABC*, México, v.48, n. 4, p. 42-47, 2003.

ROBERTS, R. J. Fish pathology. 4th. ed. [s.l.] Blackwell, 2012.

ROBINSON, R. K. Dairy Microbiology Handbook. New York: Wiley-Interscience, 765p, 2002.

ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; ALVES, L. P. L.; BRITO, M. C. A.; AMARAL, F. M. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. Chemical composition and toxicity against *Aedes aegypti* L. and *Artemia salina* Leach of the essential oil from *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. leaves. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2016.

ROSA, R.S.; LIMA, F.C.T. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. In: A.B.M. Machado, G.M. Drummond and A.P. Paglia (eds.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. 1st.ed. Vol. II. Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas. p. 8-285, 2008.

ROTTA, M.A.; QUEIROZ, J.F.d. Boas Práticas de Manejo (BPMs) para a Produção de Peixes em Tanques-rede, v. 47, p. 1517-1973, 2003.

ROTTA, M.A.; QUEIROZ, J.F.d. Boas Práticas de Manejo (BPMs) para a Produção de Peixes em Tanques-rede, v. 47, p. 1517-1973, 2003.

SAHU, M.K.; SWARNAKUMAR, N.S.; SIVAKUMAR, K.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 299-308, 2008.

SAKURAI, F. N. et al. Caracterização das propriedades funcionais das ervas aromáticas utilizadas em um hospital especializado em cardiopneumologia. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, v. 11, n. 4, p. 1097-1113, 2016.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. New York: Marcel Dekker, 628p. 2004.

SANTOS, A.B.S.; EVERTON, G.O.; JÚNIOR, R.G.O.C.; ROSA, P.V.S.; PEREIRA, A.P.M.; SOUZA, L.S.; FONSECA, D.; LIMA, E.C.S.; SOUSA, C.B.; ARRUDA, M.O.; FILHO, V.E.M. Óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* Blume e *Plectranthus amboinicus* Spreng como agentes larvicidas frente as larvas do *Aedes aegypti*. *Brazilian Journal of Development*, v.6, n.4, p.22355-22369, 2020.

SARY, C.; CARBONERA, F.; SILVA, M.C.d.; OLIVEIRA, M.; LEWANDOWSKI, V.; TODESCO, H.; VISENTAINER, J.V.; PRADO, I.N.d.; RIBEIRO, R.P. Effect of clove (*Eugenia caryophyllus*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oils in Nile tilapia diets on performance, antioxidant power and lipid oxidation in fillets. *Aquaculture Research*, v.50, p.673–679, 2019.

SAYES, C.; LEYTON, Y.; RIQUELME, C. Probiotic Bacteria as an Healthy Alternative for Fish Aquaculture. In Antibiotic Use in Animals. InTech, 2018.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia, Texto para Discussão, No. 2328, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), Brasília, 2017.

SCORVO FILHO, J.D. O agronegócio da aquicultura: perspectivas e tendências. *Panorama da Aquicultura*, 2002.

SCOPEL, B.C.; COSTA, F.S. Empreendedorismo na aquicultura. Instituto Federal. Curitiba, Paraná, 2011.

SEBASTIÃO F.A; NOMURA D; SAKABE R; PILARSKI F.; Hematology and protective performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected with *Flavobacterium columnare*. *Braz J Microb.*, v.42, p.282-289, 2011.

SEBASTIÃO, F. A.; PILARSKI, F.; KEARNEY, M. T.; SOTO, E. Molecular detection of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in three Brazilian states.

Journal of Fish Diseases, n. May, p. 1–5, 2017.

SEBASTIÃO, F. D. A.; FURLAN, L.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. *Advances in Microbiology*, June, p. 409–424, 2015.

SEBRAE. *Aquicultura no Brasil: série de estudos mercadológicos*. 2015. Acesso em: 30/04/2018. Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf)

SEDEN, M.E.A.; ABBASS, F.E.; AHMAD, M.H. EFFECT OF ORIGANUM VULGARE AS A FEED ADDITIVE ON GROWTH PERFORMANCE, FEED UTILIZATION AND WHOLE BODY COMPOSITION OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) FINGERLINGES CHALLENGED WITH PATHOGENIC *Aeromonas hydrophila*. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ.*, v.34, n.3, p.1683 - 1695, 2009.

SHAHKAR, E.; YUN, H.; KIM, D.J.; HIM, S.K.; LEE, S.C. Effects of dietary vitamin C levels on tissue ascorbic acid concentration, hematology, non-specific immune response and gonad histology in broodstock japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, v.438, p.115-121, 2015.

SHARMA, P. In vivo test to eliminate *Aeromonas hydrophilla* (bacteria) and *Aphanomyces invadans* (Fungi) by the use of probiotics. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, v.4, n.3, 2016.

SILVA, A.F.C.d.; FONSECA, J.R.S.; CARVALHO, K.V.; VIEIRA, R.A.R.; FREITAS, K.F.d.S.; DE CASTRO, V.S.; SIGNOR, A.A.; SIGNOR, A.; FREIDEN, A. Inclusão de aditivos probióticos em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e seus efeitos no desempenho, parâmetros hematológicos, hepáticos e intestinais. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 8, 2021.

SILVA, G.F.; MACIEL, L.M.; DALMASS, M.V.; GONÇALVES, M.T. Tilápia-do-Nilo: Criação e cultivo em viveiros no estado do Paraná. Curitiba, 2015. GIA. 290 p.

SILVA, JAIME F. E JÓIA, PAULO R. *Mapeamento da Bacia do Córrego João Dias, no Município de Aquidauana – MS, para fins de Planejamento Ambiental*. In: MORETTI, EDVALDO C. E CALIXTO, MARIA JOSÉ M. S. (Org.); *Geografia e Produção Regional: Sociedade e Ambiente*. Campo Grande–MS. Editora da UFMS; P. 101-124, 2003.

SILVA, L.T.d.S.; PEREIRA, U.d.P.; OLIVEIRA, H.M.d.; BRASIL, E.M.; PEREIRA, S.A.; CHAGAS, E.C.; JESUS, G.F.A.; CARDOSO, L.; MOURIÑO, J.L.P.; MARTINS, M.L. Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of *Mentha piperita* after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, v.506, p.205–211, 2019.

SILVA, N.C.C.; FERNANDES-JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Trop Dis*, v.16, n.3, p.402-13, 2010.

SILVA, R.M.L. Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da

região da baixada ocidental maranhense. 2010. 75 f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal, Jaboticabal, 2010.

SILVA, T. F. A.; PETRILLO, T. R.; YUNIS-AGUINAGA, J.; MARCUSO, P. F.; DA SILVA CLAUDIANO, G.; DE MORAES, F. R.; DE MORAES, J. R. E. Effects of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on growth performance, hematology and intestinal morphometry in cage-reared Nile tilapia. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v.43, n.5, p.963-971, 2015.

SILVA, V.V.; SALOMÃO, A.S.; MARECO, E.A.; PAI, M.D.; SANTOS, V.B. Probiotic additive affects muscle growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, v.00, p.1–9, 2020.

SILVEIRA, S.M. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de Louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo fresco. Dissertação (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SILVEIRA, U.S.; LOGATO, P.V.R.; PONTES, E.d.C. Fatores estressantes em peixes. *Revista electronica Nutritime*, v. 6, n. 4, p. 1001-1017, 2009.

SINGH, R.; SHUSHNI, M.A.M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidante activity of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, v.4, n.1, p.1-20, 2011.

SMITH, T. Greening the Blue Revolution: How History Can Inform a Sustainable Aquaculture Movement. *Electronic publishing at: Digital Access to Scholarship*. Harvard, Cambridge, Abr. 2012. Disponível em: <<http://dash.harvard.edu/handle/1/11938741>>. Acesso em: 16 de dez. 2014.

SOKOVIĆ, M. et al. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules, Basel*, v. 15, n. 11, p. 7532-7546, 2010.

SOUZA, C.F.; BALDISSERA, M.D.; VAUCHER, R.A.; LOPES, L.Q.K.; VIZZOTTO, B.S.; RAFFIN, R.P.; SANTOS, R.C.V.; VEIGA, M.L.d.; DA ROCHA, M.I.U.M.; STEFANI, L.M.; BALDISSEROTTO, B. In vivo bactericidal effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil against *Aeromonas hydrophila*: Silver catfish (*Rhamdia quelen*) as an experimental model. *Microbial Pathogenesis*, v.98, 82-87, 2016.

SOUZA, J.C.N.; SOUSA, N.C.; COUTO, M.V.S.; ABE, H.A.; DIAS, J.A.R.; PAIXÃO, P.E.G.; MENESES, J.O.; CUNHA, F.S.; PARDO, J.Q.; MEDEIROS, E.D.; SOUSA, R.C.; MARIA, A.N.; CARNEIRO, P.C.F.; FUJIMOTO, R.Y. Avaliação in vitro de cepas de bactérias com potencial probiótico isoladas do trato intestinal de tambaquis. *VII Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação*, 2019.

SPARLING, D.W. Ecotoxicology Essentials: environmental contaminants and their biological effects on animals and plants. India: Academic Press, 2016.

SPECK, G.M. *Suplementação alimentar com bactérias lácteas sobre alguns parâmetros hemato-*

*imunológicos de Jundiá (Rhamdia quelen) infectado experimentalmente com Aeromonas hydrophila*. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

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*, 2014.

STARVRI, M. et al. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.59, p.1247-1260, 2007.

STEINER, T.; ENCARNAÇÃO, P. Latest trends in gut health management. Kailua, Hawaii: Aquafeed Advances in *Processing & Formulation*, p.9-10, 2010.

SUSANTI, E.; WAHJUNINGRUM, D.; NURYATI, S.; SETIAWAI, M. The effectiveness of cinnamon powder and cinnamon leaf extract to prevent *Aeromonas hydrophila* infection on striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, v.20, n.2, p.163–173, 2021.

SUTILI, F.J. Óleos essenciais de plantas como alternativa aos fármacos convencionais na produção de peixes. 2010. 62 f. Tese (Doutorado em Farmacologia Aplicada à Produção Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Santa Maria, 2016.

SUTILI, F.J.; GATLIN, D.M.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Rev Aquacult*, v.10, p.716–726, 2017.

SUTTHI, N.; DOAN, H.V. *Saccharomyces* crevices and *Bacillus* spp. effectively enhance health tolerance of Nile tilapia under transportation stress. *Aquaculture*, v.528, 2020.

TACHIBANA, L.; TELLI, G.S.; DIAS, D.d.C.; GONÇALVES, G.S.; ISHIKAWA, C.M.; CAVALCANTE, R.B.; NATORI, M.M.; HAMED, S.B.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Effect of feeding strategy of probiotic *Enterococcus faecium* on growth performance, hematologic, biochemical parameters and non-specific immune response of Nile tilapia. *Aquaculture Reports*, v.16, 2020.

TALPUR, A.D.; IKHWANUDDIN, M. Azadirachta indica neem leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish and Shellfish Immunology*, v.34, p.254–264, 2013.

TAN, H.Y.; CHEN, S.W.; HU, S.Y. Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rummeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, v.92, p.265–275, 2019.

TAPIA-PANIAGUA, S.T.; CHABRILLÓN, M.; DÍAZROSALES, P.; BANDA, I.G.; LOBO, C.; BALEBONA, M.C.; MORIÑIGO, M.A. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, v. 60, n. 2, p. 310–319, 2010.

TARCITANO, L.A.C, MESQUITA, E.F.M. Ação dos condimentos alimentares in natura sobre a

microbiota patógena durante o processamento, preparo e/ou consumo do pescado: uma revisão sistemática de literatura. *Arquivos de Ciência do Mar.*, v.50, n.1, p.141–162, 2017.

TAVARES-DIAS, M. *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. 1 ed. Organizador. Macapá: Embrapa Amapá, 2009.

TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W.S. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos: Pedro & João Editores, V.2, 354p, 2015.

TAVECHIO, W.L.G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, v.35, n.2, p. 335-341, 2009.

TAVISH, H.M.; HARRIS, D. An economic study of essential oil production in the UK: a case study comparing non-UK lavender/lavandin production and peppermint/spearmint production with UK production techniques and costs. For the Government Industry, Forum for Non-Food Crops. The Scotch Parliament, Edinburg, 2002.

TODAR, TODAR'S Online Textbook of Bacteriology, Disponível em <<http://textbookofbacteriology.net/lactics.html>> Acesso em: 2019.

TOGHYANI, M., TOGHYANI, M., GHEISARI, A., GHALAMKARI, G., & EGHBALESAIED, S. Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. *Livestock Science*, v.138, n.1-3, p.167-173, 2011.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M.J.; MONTERO, D.; DHANASIRI, A.K.; SWEETMAN, J.; IZQUIERDO, M. Effects on mortality and stress response in European seabass, *Dicentrarchus labrax* (L.), fed mannanoligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure. *J. Fish Dis*, v.35, n.8, p. 591–602, 2012.

TORRES, D.E. Avaliação dos efeitos de microrganismos probióticos sobre o desempenho zootécnico, hematológico e tolerância ao estresse da truta do arco-íris. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Microbiologia, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R. MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. *Veterinarni Medicina*, v.56, n.10, p.486-503, 2011.

VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; KOTZENT, S.; ASSANE, I.M.; PILARSKI, F. Effects of dietary thyme essential oil on hemato-immunological indices, intestinal morphology, and microbiota of Nile tilapia. *Aquaculture International*, 2019.

VARALLO, M.A.; THOMÉ, J.N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais, *Semina: Ciências biológicas e da saúde*, v.29, n.1, p.83-104, 2008.

VÁSQUEZ, S.M.; SUÁREZ, H.; ZAPATA, B.S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, v.36, n.1, p.64-

71, 2009.

VÁZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, v.245, p.149–161, 2005.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biotechnology Reviews*, v.64, p.655-671, 2000.

VIEIRA, J.S.; LOGATO, P.V.R.; RIBEIRO, P.A.P.; FREITAS, R.; FIALHO, E.T. Efeito do processamento do milho sobre o desempenho e composição de carcaça de piaba (*Leporinus friderici*) criada em tanques-rede. *Ciência e Agrotecnológica*, v.29, p.453-458, 2005.

VIEIRA, R. H. S. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Varela, 2004.

VIEIRA, R. H. S. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Varela, 2004. WANG, Y.; LI, J.; LIN J. Probiotics in aquaculture - Challenges and outlook. *Aquaculture*, v. 281, n. 4, 2008. YILDIRIM, A.B.; TURKER, H. Antibacterial activity of some aromatic plant essential oils against fish pathogenic bacteria. *Limnofish*, v.4, n.2, p.67-74, 2018.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, v.406, p.775-781, 2000.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. Dairy Science and Technology. Boca Raton: CRC Press; 2006.

WANG, Y.; LI, J.; LIN J. Probiotics in aquaculture - Challenges and outlook. *Aquaculture*, v. 281, n. 4, 2008.

WANTANABE, W.O.; LOSORDO, T. M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trend, and challenges. *Reviews in Fisheries Science*, v. 10, n. 3/4, p. 465-498, 2002.

WHO, 2004. World Organisation for Animal Health. Organisation International des Epizooties, World Health Organization, and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004.

WON, S.; HAMIDOGLI, A.; CHOI, W.; PARK, Y.; JANG, W.J.; KONG, I.; BAI, S.C. Effects of *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactococcus lactis* on Growth, Immune Responses, Histology and Gene Expression in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Microorganisms*, v.8, p.67, 2020.

XIA, Y.; WANG, M.; GAO, F.; LU, M.; CHEN, G. Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Nutrition Journal*, 2019.

YADEGARINIA D, GACHKAR L, REZAEI MB, TAGHIZADEH M, ASTANEH SA, RASOOLI I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochem.*, v.67, p.1249-1255, 2006.

YIN, L.; CHEN, J.; WANG, K.; GENG, Y.; LAI, W.; HUANG, X.; CHEN, D.; GUO, H.; FANG, J.; CHEN, Z.; TANG, L.; HUANG, C.; LI, N.; OUYANG, P. Study the antibacterial mechanism of cinnamyldehydro against drug-resistant *Aeromonas hydrophila* in vitro. *Microbial Pathogenesis*, v.145, p.104-208, 2020.

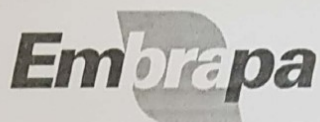
ZIMMERMANN, S. E FITZSIMMONS, K. TILAPICULTURA INTENSIVA. IN: CYRINO, J. E. P., URBINATI E. C., FRACALLOSSI D.M. E CASTAGNOLLI C. (EDS.) - *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. São Paulo, TecArt, p. 239-266, 2004.

ZORRIEHZAHRA, M.J.; DELSHAD, S.T.M.A.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; DHAMA, K.; LAZADO, C.C. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review, *Veterinary Quarterly*, v. 36, n.4, p. 228-24, 2016.

ZUCCOTI, G. V. et al. Probiotics in clinical practice: an overview. *Journal of International Medical Research*, Northampton, v. 36, n.1, p.1-53, 2008.

## **ANEXOS**





## Meio Ambiente

M.CEUA.CNPMA Nº 2/2020

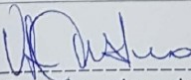
Jaguariúna, 01 de setembro de 2020.

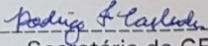
Márcia Mayumi Ishikawa  
Embrapa Meio Ambiente

### AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da inclusão de óleos essenciais e probióticos na alimentação de tilápia-do-nylo para o controle de *Aeromonas hydrophila*", registrada com o nº 003/2019 será executada por Fernanda Smaniotto, sob a responsabilidade de Márcia Mayumi Ishikawa que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente, em 01/09/2020.

|                         |                                        |
|-------------------------|----------------------------------------|
| Finalidade              | ( ) Ensino (X) Pesquisa científica     |
| Vigência da autorização | 26/08/2019 a 30/12/2021                |
| Espécie/linhagem/raça   | <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia) |
| Nº de animais           | 150                                    |
| Peso/Idade              | 60 - 70 g                              |
| Sexo                    | Machos                                 |
| Origem                  | Piscicultura Polettini                 |

  
Coordenadora da CEUA

  
Secretário da CEUA

## APÊNDICES

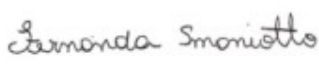
---

---

### Declaração

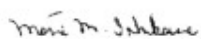
As cópias de artigos de minha autoria ou co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congresso sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada Avaliação da inclusão de óleos essenciais e probióticos na alimentação de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) para o controle de *Aeromonas hydrophila*, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 2022

Assinatura: 

Nome da autora: Fernanda Smaniotto

RG n.º: 53.967.090-X

Assinatura: 

Nome da Orientadora: Márcia Mayumi Ishikawa

RG n.º: 134.796.308.12