

Leyciane Tayana de Souza Silva

**Óleo essencial de *Mentha piperita* como aditivo alimentar à  
prevenção da estreptococose em tilápia-do-nilo**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Mestre

Orientador: Maurício Laterça Martins

Coorientadora: Edsandra Campos Chagas

Florianópolis  
2018

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

Silva, Leyciane Tayana de Souza

Óleo essencial de *Mentha piperita* como aditivo alimentar à prevenção da estreptococose em tilápia-do nilo / Leyciane Tayana de Souza Silva ; orientador, Maurício Laterça Martins, coorientadora, Edsandra Campos Chagas, 2018.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Piscicultura. 3. Hortelã pimenta. 4. Fitoterápico. 5. Suplementação dietária. I. Martins, Maurício Laterça . II. Chagas, Edsandra Campos . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Óleo essencial de *Mentha piperita* como aditivo alimentar à  
prevenção da estreptocose em tilápia-do-nilo**

Por

LEYCIANE TAYANA DE SOUZA SILVA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

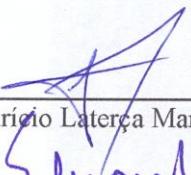
**MESTRE EM AQUICULTURA**

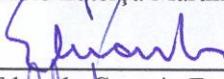
e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura.

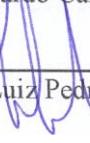
Leila Hayashi

Profa. Leila Hayashi, Dra.  
Coordenadora do PPG em Aquicultura

Banca Examinadora:

  
Dr. Maurício Lacerda Martins – Orientador

  
Dra. Eduardo Cargnin Ferreira - IFSC

  
Dr. José Luiz Peireira Mourão - UFSC



Dedico a minha mãe Leila e irmã Leyliane pelo simples fato de amá-las incondicionalmente e por estarem sempre ao meu lado.



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus que ouve e acolhe os desejos e sonhos do meu coração, providenciando em minha vida, me encorajando a superar as dificuldades e seguir os bons ventos.

Minha amada e querida família, especialmente, mamãe e irmã, Leila e Leyiane Souza, pois o amor que posso por elas é maior e mais forte que o dedicado a qualquer outra pessoa que mereceu e/ou teve meu amor e por sempre estarem ao meu lado.

A minha tão estimada família Floripa (Ewerton, Greyce, Jeisa, Moara e Thammy) irmãos que Deus me presenteou nesses dois anos, mas que levarei para sempre comigo. Ainda me surpreendo como nossas singularidades nos unem em uma coletividade coerente e cheia de amor.

Ao meu orientador, Prof. Maurício Laterça Martins, pela oportunidade, apoio, valiosa orientação e inspiração como profissional;

À Dra. Edsandra Campos Chagas, por sua coorientação e pela confiança dispensada para realização deste;

Ao Dr. Eduardo Cargnin Ferreira e ao Dr. José Luiz Pedreira Mourão pela participação na banca examinadora e por suas contribuições. A este último também serei grata por todas as sugestões e auxílio no período experimental.

A todos os amigos do Laboratório AQUOS (Beth, Bianca, Elenice, Gab, Gustavo, Hugo, Karen, Kenny, Lucas, Lúvia, Marcela, Marco, Nicollas, Nicholas, Patrícia, Scheila, Tamiris, Will e Zezinho), principalmente os que contribuíram para execução deste projeto, sempre serei grata. É aquela história né, todo mundo que me ajudou já tem a sonhada vaguinha no céu. Obrigada a todos por inúmeros momentos vividos, e por me ensinarem tanto da vida e compartilharem o amor por café;

Preciso destacar Hugo por seu grande auxílio, Lucas por ser tão paciente, prestativo e colaborar na realização das análises e Elenice por todo amor, empenho e dedicação ao meu trabalho, nem sem como te dizer obrigada amiga.

Aos queridos amigos da turma 2016.1, especialmente Kenny por sua parceria e companheirismo de sempre.

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Carlito Klunk, por ser sempre prestativo e carinhoso comigo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Mestrado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram com a realização deste trabalho, sintam-se abraçados, meus mais leais agradecimentos.



Nada do que nós somos, do que sonhamos,  
do que queremos é em vão.

(Tó Bradileone)



## RESUMO

Os óleos essenciais são obtidos a partir de materiais vegetais, que possuem atividades antibacterianas, antioxidantes, propriedades antivirais e antifúngicas, substituindo o uso de quimioterápicos no tratamento e profilaxia na piscicultura. Este estudo verificou a ação do óleo essencial de *Mentha piperita* na prevenção de estreptococose em tilápias-do-nilo. Um total de 300 peixes com aproximadamente 5 g foram divididos em 20 tanques com 15 peixes em cada e alimentados com ração suplementada com o óleo essencial nas concentrações de *Mentha* 0,075; *Mentha* 0,125; *Mentha* 0,25% e não suplementada (controle e controle com álcool de cereais) durante 50 dias, em quadruplicata. Ao final do período, quatro peixes de cada tanque foram utilizados para as análises hemato-imunológicas e os animais restantes foram submetidos a anoxia e desafiados com injeção intraperitoneal (i.p.), utilizando 1 x  $10^7$  UFC g<sup>-1</sup> de *S. agalactiae*. Durante sete dias após a infecção, os peixes foram monitorados para o registro do comportamento e mortalidade. Os índices de desempenho zootécnico foram aferidos com base em biometrias quinzenais e não apresentaram diferença significativa, assim como os hematológicos. A proteína plasmática total foi mais alta nos peixes alimentados com *Mentha* 0,125% do que nos alimentados com *Mentha* 0,25%. A suplementação com *M. piperita* foi capaz de manter o consumo de alimento dos animais no primeiro dia após o desafio, ao contrário dos animais não suplementados. A suplementação com *M. piperita* aumentou a resistência dos peixes após o desafio com *S. agalactiae*, onde *Mentha* 0,25% apresentou maior sobrevida.

**Palavras-chave:** Aquicultura; Piscicultura; Hortelã-pimenta; Fitoterápico; Suplementação dietária.



## ABSTRACT

Essential oils are obtained from vegetal material and present antibacterial activities, antioxidant, antiviral, antifungal properties and may replace the use of chemotherapeutics for treating and prophylaxis in fish farm. This study verified the influence of essential oil of *Mentha piperita* in the prevention of streptococcus in Nile tilapia. A total of 300 fish with approximately 5 g were divided into 20 tanks with 15 fish each were fed diet supplemented with essential oil at concentrations of *Mentha* 0.075; *Mentha* 0.125; *Mentha* 0.25% and no feed supplemented (control and control with cereal alcohol) in quadruplicate, during 50 days. At the end of the period, the animals were challenged intraperitoneally (i.p.) with *S. agalactiae* and four fish from each tank were used for hemato-immunological analysis. During seven days after infection, the fish were monitored every three hours for mortality registration. Zootechnical performance indexes were measured based in the biometries each 15 days along the experiments and did not present significant difference as well as the hematological parameters. Total plasmatic protein was higher in fish fed *Mentha* 0.125% than those fed *Mentha* 0.25%. Supplementation with *M. piperita* was able to keep the food consumption in fish one day after challenge, contrary to that found in unsupplemented fish. *Mentha piperita* supplementation at 0.25% increased the fish resistance after challenge with *S. agalactiae*.

**Keywords:** Aquaculture; Fish farming; Peppermint; Phytoterapeutic; Dietary supplementation



## **LISTA DE FIGURAS**

### **CAPÍTULO I**

Figura 1 - Desenho esquemático dos procedimentos ao longo do período experimental..... 42

Figura 2 - Mortalidade cumulativa de *Oreochromis niloticus* alimentada com dietas contendo diferentes concentrações de *Mentha piperita* (0,075%; 0,125%; 0,25%), Controle e Controle <sub>ração+álcool</sub>, após desafio experimental com *Streptococcus agalactiae* ..... 47

### **APÊNDICE**

Figura 1 - Biometria dos peixes ..... 79

Figura 2 - Tilápia do Nilo infectada com *Streptococcus* sp apresentando exoftalmia acentuada..... 79

Figura 3 - Reisolamento da bactéria pelo postulado de Koch, a fim de confirmar o quadro de doença, mostrando os órgãos internos do peixe liquefeitos ..... 80



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1 – Composição do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> (%) n.i = compostos não identificados .....	43
Tabela 2 – Mínima concentração inibitória (MIC) do óleo essencial de <i>M. piperita</i> contra duas espécies de bactérias patogênicas: <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Aeromonas hidrófila</i> .....	44
Tabela 3 – Parâmetros de desempenho zootécnico (media ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo após 50 dias de suplementação com óleo essencial de hortelã ( <i>Mentha piperita</i> ) em diferentes concentrações (0,075%; 0,125%; 0,25%), Controle e Controle <sub>ração+álcool</sub> . TCE = taxa de crescimento específico, EA= fator de conversão alimentar. Letras distintas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.....	44
Tabela 4 – Parâmetros hematológicos (média ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo após 50 dias de suplementação com óleo essencial de hortelã ( <i>Mentha piperita</i> ) em diferentes concentrações (0,075%; 0,125%; 0,25%), Controle e Controle <sub>ração+álcool</sub> . VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, HCM = proteína plasmática total. Letras distintas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.....	45
Tabela 5 – Parâmetros imunológicos do plasma (media ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo após 50 dias de suplementação com óleo essencial de hortelã ( <i>Mentha piperita</i> ) em diferentes concentrações (0,075%; 0,125%; 0,25%), Controle e Controle <sub>ração+álcool</sub> .....	46



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>21</b>
SANIDADE DE PEIXES.....	21
ENFERMIDADES BACTERIANAS EM TILÁPIAS .....	21
USO DE FITOTERÁPICOS .....	24
ÓLEOS ESSENCIAIS .....	27
HORTELÃ PIMENTA ( <i>Mentha piperita</i> ) .....	29
<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>31</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>33</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>35</b>
<b>2. Material e métodos .....</b>	<b>36</b>
<i>2.1 Obtenção e composição dos óleos essenciais .....</i>	<i>36</i>
<i>2.2 Mínima Concentração Inibitória (MIC).....</i>	<i>37</i>
<i>2.3 Material biológico e desenho experimental .....</i>	<i>38</i>
<i>2.4 Preparo das dietas experimentais .....</i>	<i>38</i>
<i>2.5 Alimentação e biometria .....</i>	<i>39</i>
<i>2.6 Análise hematológica .....</i>	<i>39</i>
<i>2.7 Obtenção de plasma para análises imunológicas .....</i>	<i>39</i>
<i>2.8 Atividade antimicrobiana do plasma .....</i>	<i>39</i>
<i>2.9 Atividade aglutinante do plasma .....</i>	<i>40</i>
<i>2.10 Imunoglobulina total .....</i>	<i>40</i>
<i>2.11 Avaliação dos parâmetros de desempenho zootécnico .....</i>	<i>41</i>
<i>2.12 Desafio com <i>Streptococcus agalactiae</i>.....</i>	<i>41</i>
<i>2.13 Análises estatísticas.....</i>	<i>42</i>

<b>3. Resultados.....</b>	<b>42</b>
3.1. <i>Composição dos óleos essenciais .....</i>	42
3.2. <i>Mínima concentração inibitória (MIC) .....</i>	44
3.3. <i>Desempenho zootécnico.....</i>	44
3.4. <i>Parâmetros hematológicos .....</i>	45
3.5. <i>Parâmetros imunológicos .....</i>	46
3.6. <i>Mortalidade após o desafio.....</i>	46
<b>4. Discussão.....</b>	<b>47</b>
<b>5 Agradecimentos.....</b>	<b>51</b>
<b>6 Referências.....</b>	<b>52</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>61</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>79</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

### SANIDADE DE PEIXES

Simultaneamente ao desenvolvimento da produção do setor aquícola, existe a necessidade de manejo adequado nos cultivos, direcionando atenção ao ambiente aquático e a sanidade dos animais cultivados (MARTINS, 2004). A extinção de enfermidades nos cultivos trata-se de uma prática inevitável, devido às questões técnicas e econômicas. Portanto, o gerenciamento de técnicas para o controle e prevenção de doenças nas pisciculturas cumpre papel fundamental, minimizando impactos ambientais (NOGA, 2010).

Os processos bioquímicos, metabólicos e fisiológicos dos peixes, são basicamente iguais aos dos mamíferos. Assim sendo, os peixes são vulneráveis aos mesmos grupos de patógenos que afetam animais de sangue quente, abrangendo vírus, bactérias, fungos e parasitos (NOGA, 2010). Contudo, o estresse exerce uma função importante na ocorrência de doenças em peixes (SCHRECK, 2000).

Os parâmetros sanguíneos podem ser utilizados como indicadores biológicos no controle da saúde dos peixes e do ambiente, sendo um rápido instrumento na identificação do estresse (TAVARES-DIAS, 2009). Essas informações podem ser usadas a fim de aferir o estado fisiológico dos organismos padronizando as condições ideais de cultivo (ARAÚJO et al., 2009). Como exemplo, as variáveis referentes ao eritrograma ajudam no diagnóstico de processos de anemias, enquanto o leucograma ajuda na identificação de processos infecciosos e outros estados de desequilíbrio homeostático, como a toxicidade de uma substância (RANZANI-PAIVA et al., 2004).

O sistema imunológico de peixes é composto por sistema inato e adaptativo, a imunidade não específica é importante para esses animais, além de exercer função fundamental na ativação da resposta imunológica adquirida (MAGNADOTTIR, 2006, 2010; URIBE et al., 2011). Esta resposta pode promover efeitos inibitórios do estresse agudo ou crônico, originando redução na sua resistência a doenças (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; BARCELLOS et al., 2004).

### ENFERMIDADES BACTERIANAS EM TILÁPIAS

A intensificação dos cultivos, além dos benefícios na produção, apresenta como consequência alteração na qualidade da água e estres-

se crônico nos peixes, devido ao confinamento e ao manejo (ou estresse provocado pelo manejo), situação que pode facilitar a proliferação de patógenos (MARTINS, 2004). Tais condições adversas enfrentadas por organismos cultivados, reduzem a capacidade imunológica, as quais podem promover a manifestação de doenças e, consequentemente causa a mortalidade dos peixes (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

Os surtos de enfermidades ocorrem quando um desequilíbrio aumenta a susceptibilidade do hospedeiro, comumente às condições de estresse que ocorrem no ambiente de cultivo (MORAES; MARTINS, 2004; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008). Em razão de sua rusticidade, primeiramente as tilápias foram consideradas mais resistentes às bactérias, fungos, parasitos e doenças virais, quando comparadas às demais espécies de peixes cultiváveis (AMAL; ZAMRISAAD, 2011). Mesmo assim, diversas doenças infecciosas e parasitárias são observadas no cultivo deste peixe.

As enfermidades bacterianas, comumente de caráter sistêmico, costumam causar altas taxas de mortalidade na piscicultura (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008). Dentre as bacterioses que afetam a tilapicultura destacam-se os gêneros *Streptococcus*, *Francisella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Edwardsiella* e *Enterococcus* (EL - SAYED, 2006, SILVA et al., 2009, DONG et al., 2015). Quando presentes no ambiente estagnam o desenvolvimento do cultivo, devido aos inúmeros sinais clínicos provocados, que podem levar a mortalidade (KUBITZA, 2008).

Os microrganismos do gênero *Streptococcus* são classificadas como cocos Gram positivos, medem aproximadamente 1 µm de diâmetro, constituem cadeias, são catalase-negativas, anaeróbias facultativas e imóveis (ROBERTS, 2012). Esteptococose é um problema global e ascendente na aquicultura, em razão à grande distribuição geográfica de seus agentes causadores, a ampla variedade de espécies de peixes afetadas, as elevadas mortalidades causadas, altos custos com o tratamento, a redução no crescimento e a dificuldade na comercialização dos animais (JIMÉNEZ et al., 2007).

A forma de transmissão pode dar-se por meio do contato direto entre o peixe infectado e saudável, ou pelo contato indireto, através da água e pelas fezes dos animais infectados, onde a bactéria pode permanecer na coluna d'água aumentando a probabilidade de propagação via fecal-oral (FIGUEIREDO; MIAN; GODOY, 2007; NGUYEN et al. 2002). Outro modo é a via oral, por meio do canibalismo dos peixes mortos ou moribundos induzindo a propagação da doença (WONGSATHEIN, 2012).

A patogenicidade de *Streptococcus* spp. está associada às condições de estresse relacionado à qualidade da água e condições de criação intensiva (BUNCH; BEJERANO, 1997). Geralmente tilápias infectadas com estreptococose mostram sinais clínicos distintos, dependendo da espécie de *Streptococcus* e da tilápia (CONROY, 2009). Os sinais clínicos que mais se destacam são: natação errática, anorexia, escurecimento da pele, letargia, curvatura do corpo, exoftalmia junto a opacidade de córnea e/ou hemorragia intraocular uni ou bilateral, sufusões no opérculo e base das nadadeiras, ulceração da epiderme e morte. As lesões internas são caracterizadas por congestão branquial, hepatomegalia e esplenomegalia acompanhada de congestão, ascite e encefalomalácea (SALVADOR et al. 2003, 2005, FIGUEIREDO et al. 2006, TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MARCUSSO et al. 2015; MARCUSSO; SALVADOR; MARINHO-NETO, 2017). A infecção por *S. agalactiae* nos peixes, causa doença septicêmica, ou seja, a bactéria multiplica-se na corrente sanguínea e em diversos órgãos, como fígado, baço e rim (PLUMB, 1999; BHUJEL, 2014; YAMASHITA et al., 2015).

O fato de *S. agalactiae* oferecer risco zoonótico afeta também a segurança alimentar associada ao consumo do pescado (PEREIRA et al., 2010). Para controle da estreptococose na piscicultura, utiliza-se rações medicadas com antibióticos. Ainda assim, este tratamento não é tão efetivo em diagnósticos tardios (FIGUEIREDO, GODOY; LEAL, 2008). Em casos de infecção avançada, os peixes param de se alimentar, restringindo o resultado do tratamento (KUBITZA, 2001). O uso de quimioterápicos no ambiente aquático pode gerar amplo impacto como à seleção de patógenos resistentes e o acúmulo de resíduos químicos na água e no músculo (FIGUEIREDO; LEAL, 2008). Atualmente, poucos antibióticos são legalmente aprovados para uso na aquicultura e vários países rejeitam a importação de pescado tratado com antibióticos sintéticos (GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014). No Brasil somente dois princípios ativos autorizados em produtos formulados pelo Ministério da Agricultura para emprego na aquicultura: o florfenicol e oxitetraciclina (REZENDE, 2012; ANDRADE; SOUSA; MORAIS, 2017). Este último, não é capaz de promover a cura completa em casos de infecção pela bactéria *Streptococcus agalactiae* em tilápias, levando ao aparecimento de portadores assintomáticos e ocasionando a persistência do agente bacteriano na produção (FARIA et al., 2013). Há um outro medicamento, a neomicina, destinada apenas a peixes ornamentais (PÁDUA; FILHO; CRUZ, 2012).

Outra opção consiste nas vacinas, porém propiciam proteção espécie-específica contra uma única enfermidade, à medida que o uso profilático de substâncias imunomoduladoras pode preparar o organismo a combater um vasto número de agentes etiológicos (DÜGENCI et al., 2003). Existe no Brasil vacina comercial já disponível para peixes contra *S. agalactiae* (grupo b), a AquaVac Strep As, com comprovada eficiência contra a infecção (ZANOLO, 2011). Todavia, sua aplicação compreende custos e demanda manejo dos animais, além de ser recomendada apenas para peixes com mais de 15 g (PRIDGEON; KLESIUS, 2013).

Segundo Noga (2010) a supressão de enfermidades na piscicultura é considerada inviável, em razão de questões técnicas e econômicas. Desse modo, o gerenciamento de estratégias para o controle de doenças no cultivo de peixes cumpre papel essencial com maior importância no futuro, mitigando impactos ambientais. O êxito da piscicultura é consequência da manutenção de um ambiente livre de fatores nocivos que possam causar prejuízos aos animais e comprometer a produção (MARTINS et al., 2010).

## USO DE FITOTERÁPICOS

Para combater as enfermidades ocorrentes nos cultivos, o uso de antibióticos e quimioterápicos no tratamento e profilaxia de organismos aquáticos tem sido largamente criticado por seu impacto negativo, e com isso o desenvolvimento e uso de fitoterápicos como alternativa aos antibióticos no tratamento de doenças estão se destacando no setor de sanidade de organismos aquáticos (SAHU et al., 2007). O fato de geralmente, os fitoterápicos serem eficazes quando comparados aos quimioterápicos sintéticos, mais baratos e ainda pode melhorar as funções imunológicas não específicas dos peixes (MURTHY; KIRAN, 2013; BULFON; VOLPATTI; GALEOTTI, 2015) proporciona o crescimento da procura por uma alternativa natural, no desenvolvimento de novas estratégias de suplementação dietética que promovam crescimento e saúde (DENEV, 2008).

Produtos naturais são compostos bioativos obtidos a partir de matéria-prima vegetal, como extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, entre outros produtos (ANVISA, 2003). Por definição, fitoterápicos consistem em produtos obtidos de plantas medicinais, ou seus derivados, com finalidade profilática, curativa ou paliativa (BRASIL, 2011). São geralmente oriundos de plantas medicinais, e suas aplicações terapêuticas incluem tratamento e prevenção de enfermidades. São

amplamente utilizados na medicina humana e vêm despertando interesse para a aquicultura por serem mais seguros quando comparados aos produtos sintéticos normalmente utilizado, por motivo de sua menor toxicidade, menor impacto ambiental relacionado à contaminação de corpos d'água, diminuição dos resíduos químicos na carne dos animais e menor risco de seleção de patógenos resistentes (COIMBRA et al., 2006).

Fitoterápicos são medicamentos obtidos do uso exclusivo de partes dos vegetais ou o próprio vegetal como matéria-prima (ANVISA, 2011; VALLADÃO, 2014). Os fitoterápicos têm sua propriedade descrita há séculos no tratamento de infecções bacterianas e parasitárias de humanos e animais (SILVA; FERNANDES-JUNIOR, 2010).

O fator principal que estimula as pesquisas na descoberta de antimicrobianos a partir de espécies vegetais é a necessidade de novos compostos para classes terapêuticas (COWAN, 1999). Algumas das soluções para o controle e prevenção de doenças em peixes é o desenvolvimento de vacinas (PRIDGEON; KLESIUS, 2013) e dietas imunoestimulantes (SKALLI et al., 2013), sendo que dentro destas, vários fitoterápicos têm mostrado resultados promissores na profilaxia de doenças e melhora de resposta imunológica (SAMAD et al., 2014; VASEEHARAN et al., 2014; BRUM et al., 2017).

O uso de plantas como aditivos na ração pode ser uma alternativa na prevenção de doenças infecciosas na aquicultura, pois estimulam o mecanismo de defesa celular e humoral não específica em peixes (MAQSOOD et al., 2011; TALPUR; IKHWANUDDIN; BOLONG, 2013; TALPUR, 2014). Por exemplo, *M. piperita* na dieta de peixes mostrou seus efeitos imunoestimulantes positivos elevando os elementos humorais no soro como resultado de compostos bioativos presentes na folha da planta, consequentemente aumentando a imunidade inespecífica dos peixes (TALPUR, 2014). Os extratos vegetais comumente possuem pelo menos um componente com propriedade antimicrobiana e vêm se destacando como substâncias de efeito imunomodulador (KOTZEKIDOU; GIANNAKIDS; BOULAMATSIS, 2007).

Há um crescente interesse global no uso de princípios ativos vegetais como imunomoduladores na aquicultura (GOVIND; MADHURI; MANDLOI, 2012; BULFON; VOLPATTI; GALEOTTI, 2015; AWAD; AWAAD, 2017). Imunomoduladores são compostos que podem intervir nos mecanismos imunológicos, com ação estimulatória ou inibitória, levando o animal a um estado mais saudável (NUNES-PINHEIRO et al., 2003). Diferentes produtos naturais possuem efeito confirmado sobre o sistema imunológico, atribuindo ativação precoce

para os mecanismos de defesa não-específicos e aumento na resposta imune específica de peixes. (VASEEHARAN; THAYA, 2013). Os imunomoduladores são capazes de, concomitantemente, estimular alguns mecanismos de defesa e suprimir outros (NUNES-PINHEIRO et al., 2003), incrementar resistência do animal a doenças (BRICKNELL; DALMO, 2005).

Os imunomoduladores podem imunoestimular ou imunossuprimir os animais, ou seja, aumentar ou diminuir os mecanismos de defesa do hospedeiro (MASIHI, 2000). Elevam os mecanismos que compreendem tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida, por meio da ativação de células e mediadores, a medida que os imunossupressores atuam exclusivamente sobre os mecanismos envolvidos na imunidade adquirida (STITES; TERR, 1995).

Produtos naturais podem ser utilizados como prevenção durante as fases mais críticas do ciclo de produção, onde os organismos encontram-se mais suscetíveis a agentes infecciosos, como por exemplo a larvicultura, manejos de classificação, transporte ou vacinação (BRICKNELL; DALMO, 2005). Podem ser utilizados para complementar a vacinação, ampliando sua eficácia e a magnitude da resposta imune, principalmente após a injeção intraperitoneal da vacina (MULERO, et al., 1998). Por outro lado, existem diversos relatos de respostas não benéficos (BAULNY et al., 1996; KAWAKAMI SHINOHARA; SAKAI, 1998; BULLOCK et al., 2000, WHIPPLE; GANNAM; BARTHOLOMEW, 2002) e tóxicas (BULLOCK et al., 2000, SALINAS et al., 2004).

A administração destes produtos pode ser feita de diferentes formas, via injeção intraperitoneal (i.p.), banho de imersão ou suplementação na dieta (SAHU et al, 2007).

Os fitoterápicos apresentam atividade antibacteriana contra patógenos humanos (USHIMARU et al., 2012) e animais (DAL-POZZO et al., 2011), e a alteração dos antibacterianos contemporâneos por produtos naturais na aquicultura vem se elucidando em vários estudos. Diferentes plantas medicinais mostram atividade contra relevantes bactérias patogênicas de peixe, como extrato de *Allium sativum* contra *Aeromonas hydrophila* de *Pangasius hypophthalmus* (MUNIRUZZAMAN; CHOWDHURY, 2008), *Rosmarinus officinalis* em *Oreochromis* sp. desafiadas com *Streptococcus iniae* (ABUTBUL et al., 2004), *Rosmarinus officinalis* para *Streptococcus iniae* de *Oreochromis* sp. (ZILBERG et al., 2010) todos com inclusão na ração e banhos de *Centella asiatica* também para tilápia com *Flavobacterium columnare* (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN,

2010), *Pangasius hypophthalmus* alimentados com *Calotropis gigantea* contra *Edwardsiella tarda* (MUNIRUZZAMAN; CHOWDHURY, 2008). Há uma apreensão com o aparecimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos e isso se deve especialmente ao uso indiscriminado e sem conhecimento na aquicultura (CABELLO, 2006), em contrapartida a capacidade dos fitoterápicos causarem resistência bacteriana é baixa (KULKARNI et al., 2013).

Os óleos essenciais têm se destacado como antiparasitários e antimicrobianos contra vários microrganismos, englobando os deteriorantes de alimentos (CONNOR; BEUCHAT, 1984; OUATTARA et. al, 1997), de medicamentos e produtos cosméticos (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003) e os que acometem plantas e animais (ROMERO et. al. 1989; PINTO, 2010). Dentre os grupos existentes, os óleos essenciais são os mais estudados como aditivos na alimentação humana e animal, pois grande parte dos compostos ativos da planta estão presentes em maior quantidade no óleo. (OETTING et al., 2005).

## ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são extraídos de plantas geralmente por meio do processo de arraste a vapor ou expressão de pericarpo de frutos cítricos. As matérias-primas usadas para sua produção são as flores, folhas, cascas, rizomas e frutos. Em sua composição apresentam sobretudo mono, sesquiterpenos e fenilpropanoides, metabólitos que atribuem suas características organolépticas (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Constituem os elementos voláteis presentes em muitos órgãos vegetais, e, estão ligados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, cumprindo função significativa na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000; LIMA et. al, 2006).

Os óleos essenciais são formados por inúmeros compostos, às vezes se sobressaindo alguns, e a sua atividade está relacionada a ação destes compostos majoritários e o conjunto de substâncias (VANDAR-ÜNLÜ et al., 2003; LIMA; CARDOSO, 2007).

Para Morais (2009), a composição química destes óleos é determinada por fatores genéticos. Entretanto, outros elementos podem ocasionar alterações expressivas na produção dos metabólitos secundários. Estes metabólitos importam uma conexão química entre as plantas e o ambiente. Dentre estes fatores, podem-se destacar as interações entre os microrganismos, insetos, idade, estágio de desenvolvimento, fotoperíodo, temperatura, pluviosidade, nutrição, época, horário de coleta, bem como técnicas de colheita, pós-colheita e a

própria planta. Por exemplo, para hortelã-pimenta em dias curtos mentofurana exibe maior concentração, enquanto em dias longos são mentol e mentona que apresentam-se como marjoritários (VOIRIN; BRUN; BAYET, 1990). Assim como, a concentração de mentol é diretamente proporcional aos níveis de potássio e invertamente ao de nitrogênio (MORAIS, 2009).

É apropriado ressaltar que estes fatores podem mostrar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário (MORAIS, 2009).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais se dá através da expansão da membrana, aumento da sua fluidez e permeabilidade, desordenando as proteínas nela embebidas, inibindo a respiração e alterando o processo de transporte de íons (TROMBETA et al., 2005). Por meio de seus compostos aromáticos e fenólicos, agem diretamente na membrana citoplasmática, provocando alterações na sua estrutura e funções (HOLLEY; PATEL, 2005), desnaturando e coagulando proteínas, além de promover a suspensão dos processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, reações como a fosforilação e levando a perda do controle quimiosmótico e morte celular (DORMAN; DEANS, 2000).

O modo como os óleos essenciais intensificam o desempenho dos animais ainda não está claramente definido, porém, admite-se que estes compostos estimulam a secreção de enzimas endógenas, digestão, palatabilidade, motivam a circulação sanguínea, desempenham ação antioxidante, alteram a microbiota intestinal e auxiliam na redução de infecções bacterianas, fúngicas, virais e parasitárias, por exemplo, diminuindo os níveis de bactérias patogênicas, consequentemente podem melhorar o estado imunológico (GARCIA et al., 2007; JANG et al., 2007; SANTURIO et al., 2007; BONATO et al., 2008; BASMACIOĞLU MALAYOĞLU et al., 2010).

O óleo essencial (OE) de *Melaleuca alternifolia* tem vasto efeito antisséptico (THOMSEN et al. 2011), com atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitária (CARSON et al. 2006), inseticida e repelente (CALLANDER; JAMES, 2012). Lima (2015), adicionando óleo de *Citrus sinensis* na dieta de tilápia (*Oreochromis niloticus*), observou ação antimicrobiana, pela melhora significativa nos parâmetros hematológicos e na atividade respiratória de leucócitos dos peixes desafiados com *S. agalactiae*. Talpur (2014) verificou com extrato de *M. piperita* suplementada na dieta, aumento da sobrevivência e desempenho zootécnico de barramundi (*Lates calcarifer*), desafiados com *Vibrio harveyi*. Já Ribeiro et al. (2016), avaliaram concentrações de

óleo essencial de *M. piperita* (0; 0,5; 1 e 1,5%) como imunoestimulantes na dieta de tambaqui (*Colossoma macropomum*), contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*, na concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>, recomendando o uso e inclusão de até 1,0%. *Lippia alba* apresentou comprovada atividade anestésica, antiparasitária e antimicrobiana em peixes (CUNHA et al., 2010, 2011; TONI et al., 2014; SUTILI et al., 2015; SOARES et al., 2016).

### HORTELÃ PIMENTA (*Mentha piperita*)

O gênero *Mentha* ocupa posição de destaque na economia mundial entre as plantas produtoras de óleos essenciais (HARRIS, 2006). É o mais importante da família Lamiaceae em função de possuir 18 espécies e 11 híbridos (TUCKER; NACZI, 2007), sendo o óleo essencial de *M. piperita* um dos dezoito principais óleos essenciais de importância econômica mundial (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). É classificada como uma planta híbrida resultante de um cruzamento entre hortelã-verde (*Mentha spicata*) e hortelã-da-água (*Mentha aquatica*) (ISCAN et al., 2002). A hibridização se dá comumente com o contato das espécies de *Mentha*, cooperando para a complexa variação que distingue as espécies selvagens e cultivadas. Além disso, por meio da elevada variabilidade morfológica, muitas espécies são definidas por uma ampla diversidade química de seus constituintes. (FAROOQI et al., 1999; GARLET, 2007).

A hortelã é uma das ervas medicinais mais antigas do mundo e tem sido usada nas tradições oriental e ocidental (KEIFER, 2007). Os egípcios, romanos e gregos, cultivavam e utilizavam folhas de hortelã para indigestão, sendo que a planta foi também empregada pelos europeus para complicações no estômago e menstruais (TYLER; BRADY; ROBBERTS, 1988; FOSTER et al., 1990). Atualmente, o hortelã-pimenta é uma planta aromática e medicinal amplamente utilizada, além da medicina tradicional na indústria de alimentos e bebidas, perfumaria, cosmética e farmácia. Seus principais benefícios consistem em melhorias nas queixas digestivas, efeito relaxante no estômago e estimulante do apetite (MCKAY; BLUMBERG, 2006). Destacam-se pelo uso culinário e em chás medicinais, em razão do sabor e aroma refrescante (GARLET, 2007).

Quanto a composição química, os dezoito óleos essenciais de *Mentha* spp. apresentam grande variabilidade, porém são os monoterpenos (mentol, mentona, carvona, linalol e acetato de linalila) os componentes de maior valor econômico (GARLET et al., 2007; SANTOS et al., 2012;

DESCHAMPS et al., 2013). Bassolé et al. (2010) identificou no óleo essencial de *M. piperita* dezessete componentes químicos sendo os principais o mentol (39,3%) e mentona (25,2%). O mentol tem sido relatado como composto que contribui para o potencial antibacteriano da planta (MATOS et al., 2009). Junto aos demais compostos majoritários mentona, acetato de metila, iso-mentona (SINGH, et al., 2011).

Junto a outras plantas, *Mentha* spp. tem demonstrado propriedades antimicrobianas (MAHBOUBI; HAGHI, 2008), antioxidantes (MIMICA-DUKIC et al., 2003), sobre o colesterol (HARDARI; NOBAKHT; SAFAMEHR, 2010), antifúngicas (HADIAN; GHASEMNEZHAD; RANJBAR, 2008), anti-úlcera e anti-inflamatória (BLUMENTHAL, 1998), e efeitos significativos sobre os parâmetros sanguíneos e imunidade (NOBAKHT; MEHMANNAVAZ, 2010), triglicerídeos (AKDOGAN et al., 2004); têm propriedades antimutagênicas (YU; XU; DASHWOOD, 2004) e estimulante, carminativo e antiespasmódico e propriedades de antídoto para venenos (BHATTACHARJEE, 1998).

O óleo essencial de hortelã-pimenta aplicado em banhos possui efeito antiparasitário contra helmintos parasitos de peixes (COSTA et al., 2017; HASHIMOTO et al., 2016; MALHEIROS et al., 2016) e *Ichthyophthirius multifiliis* (VALLADÃO et al., 2016). Promove melhora nos parâmetros hematológicas e imune da truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (ADEL, et al., 2016), no peixe branco do Cáspio (*Rutilus frisii kutum*), alimentados com extrato da planta (ADEL, et al., 2015), e em barramundi (*Lates calcarifer*), com pó de folhas de hortelã-pimenta presente na alimentação (TALPUR, 2014) e seu óleo essencial altera os parâmetros hematológicos e bioquímicos do tambaqui (*Colossoma macropomum*) (RIBEIRO et al., 2016)

*Mentha piperita* mostrou alta eficácia e resultado positivo sobre os parâmetros hematológicos e atividade antihelmíntica em tilápias, recomendando-se a concentração de 40 mL·L<sup>-1</sup> de óleo em banhos terapêuticos para monogenoides (HASHIMOTO et al., 2016). Outra forma de inclusão, consiste na suplementação na dieta. Ribeiro et al. (2016) avaliaram concentrações de óleo essencial de *M. piperita* como iunoestimulantes de tambaqui desafiados com *A. hydrophila*, recomendando o uso em inclusão de até 1,0%. Em outro estudo, Talpur (2014) verificou aumento da sobrevivência, ganho de peso, conversão alimentar e redução da mortalidade de barramundi desafiados com *Vibrio harveyi* com extrato de *M. piperita* suplementado na dieta nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 g/kg de ração.

Dessa maneira, a ação imunoestimulante dos óleos essenciais têm demonstrado efeitos benéficos para peixes cultivados, não apenas como uma alternativa para o manejo de doenças, mas também para promover o crescimento e alcançar melhorias do sistema imunitário (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM, 2008; HARIKRISHNAN, 2009; HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; HEO, 2009; MEHANA; RAHMANI; ALY, 2015; RIBEIRO, 2016).

## JUSTIFICATIVA

Em resposta à pressão para redução do uso de antibióticos e quimioterápicos que acarretam desvantagens, como toxicidade, contaminação do pescado e do esgoto de cultivo, alternativas seguras e eficientes têm sido estudadas. Uma opção eficaz consiste na suplementação com produtos naturais como prevenção ao uso de fármacos sintéticos nas dietas de peixes. Os aditivos naturais possuem maior potencial de biodegradação, menor toxicidade e risco de seleção de patógenos resistentes. O emprego dessas substâncias imunomoduladoras, como o óleo essencial de *Mentha piperita*, pode melhorar a sobrevivência e capacitar os animais no combate à agentes patogênicos. Devido aos prejuízos causados por enfermidades na economia do setor, destaca-se a relevância deste estudo como opção para mitigar os impactos ambientais e sanitários causados por quimioterápicos, além da promoção de um programa de manejo eficiente.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Verificar a ação do óleo essencial de *Mentha piperita* na prevenção de estreptococose em tilápias-do-nilo.

### Objetivos Específicos

- Determinar a mínima concentração inibitória de *Mentha piperita* sobre as bactérias *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*;

- Avaliar a influência da suplementação dietária com *Mentha piperita* sobre as taxas de crescimento, eficiência alimentar e eficiência proteica em tilápia-do-nilo;
- Avaliar a influência da suplementação dietária com *Mentha piperita* sobre os parâmetros hematológicos e imunológicos da espécie;
- Verificar a influência da suplementação dietária com *Mentha piperita* sobre comportamento, alimentação e taxa de mortalidade em tilápia-do-nilo desafiadas com *Streptococcus galactiae*;

## CAPÍTULO I

### Suplementação dietária com óleo essencial de *Mentha piperita* em tilápia-do-nilo

“Dietary supplementation with essential oil of *Mentha piperita* in Nile tilapia”

#### Resumo

Os óleos essenciais são obtidos a partir de materiais vegetais, que possuem atividades antibacterianas, antioxidantes, propriedades antivirais e antifúngicas, substituindo o uso de quimioterápicos na profilaxia e tratamento na piscicultura. Este estudo verificou a ação do óleo essencial de *Mentha piperita* na prevenção de estreptococose em tilápias-do-nilo. Um total de 300 peixes com aproximadamente 5 g foram divididos em 20 tanques com 15 peixes em cada e alimentados com ração suplementada com o óleo essencial nas concentrações de *Mentha* 0,075; *Mentha* 0,125; *Mentha* 0,25% e dois controles, um só com a ração comercial e outro com ração+álcool de cereais durante 50 dias, em quadruplicata. Ao final do período, quatro peixes de cada tanque foram utilizados para as análises hemato-imunológicas e os animais restantes foram desafiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de *S. agalactiae*. Durante sete dias após a infecção, os peixes foram monitorados a cada três horas para o registro da mortalidade. Os índices de desempenho zootécnico foram aferidos com base em biometrias quinzenais no período de experimento e não apresentaram diferença significativa, assim como os hematológicos. A proteína plasmática total foi mais alta nos peixes alimentados com *Mentha* 0,125% do que nos alimentados com *Mentha* 0,25%. A suplementação com *M. piperita* foi capaz de manter o consumo de alimento dos animais no primeiro dia após o desafio, ao contrário dos animais não supplementados. A sobrevivência foi significativamente maior em peixes alimentados com *Mentha* 0,25%. A suplementação com o óleo essencial aumentou a resistência dos peixes após o desafio com *S. agalactiae*.

**Palavras-chave:** Piscicultura; Hortelã-pimenta; Hematologia; Imunologia; Fitoterápico; Suplementação dietária

## Abstract

Essential oils are obtained from vegetal material and present antibacterial activities, antioxidant, antiviral, antifungal properties and may replace the use of chemotherapeutics for treating and prophylaxis in fish farm. The objective of this study was to verify the influence of essential oil of *Mentha piperita* in the prevention of streptococcus in Nile tilapia. A total of 300 fish with approximately 5 g were divided into 20 tanks with 15 fish each were fed diet supplemented with essential oil at concentrations of *Mentha* 0.075; *Mentha* 0.125; *Mentha* 0.25% and two controls (commercial feed and feed + cereal alcohol) in quadruplicate, during 50 days. At the end of the supplementation period, four fish from each experimental unit were collected for hemato-immunological analysis and the rest of the animals were challenged against *Streptococcus agalactiae* intraperitoneally. During seven days after infection, the fish were monitored every three hours for mortality registration. Zootechnical performance indexes were measured based in the biometries each 15 days along the experiment and did not present significant difference as well as the hematological parameters. Total plasmatic protein was higher in fish fed *Mentha* 0.125% than those fed *Mentha* 0.25%. Supplementation with *Mentha piperita* was able to maintain feed consumption of the animals on the first day after challenge, unlike non-supplemented animals. Survival was significantly higher in fish fed with *Mentha* 0.25%. The supplementation with the essential oil increased the resistance of the fish after the challenge with *S. agalactiae*

**Keywords:** Fish farming; Peppermint; Hematology; Immunology; Phytoterapeutic; Dietary supplementation

Artigo nas normas da *Aquaculture International*

## 1. Introdução

Infecções causadas por *Streptococcus* spp. são a principal causa de perdas na produção da tilápia, representadas principalmente por *Streptococcus agalactiae* e *S. iniae* (MSD Animal Health, 2012). O primeiro surto de estreptococose foi registrado no Japão em cultivo de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Wu, 1970). Posteriormente, foi relatado nos EUA em peixes de água doce, dourado (*Notemigonus crysoleucas*) e em peixes marinhos, incluindo a tainha (*Mugil cephalus*) e bagre marinho (*Arius felis*) (Evans et al., 2006).

Outros surtos de estreptococose foram relatados em trutas arco-íris cultivadas na África do Sul e na Espanha (Abutbul, 2004). Esta bactéria é reconhecida por originar infecção em humanos e gado e classificado recentemente como um patógeno de peixe com potencial zoonótico (Evans et al., 2009).

Como alternativa aos antibióticos e vacinas, o uso de produtos naturais como fitoterápicos para o controle das bacterioses está se destacando no setor de sanidade de organismos aquáticos (Sahu et al., 2007). Dentre os fitoterápicos, os óleos essenciais têm apresentado destaque na aquicultura por fornecerem compostos seguros e ecológicos em substituição aos antibióticos e compostos químicos, bem como possuem ações benéficas no status imunológico e controle de doenças dos peixes (Awad e Awaad, 2017).

Apesar dos efeitos mais suaves dos fitoterápicos no corpo, eles podem ter resultados mais duradouros do que os sintéticos (Awaad, 2009). Quando utilizados como tratamento, os óleos essenciais possuem características de sinergia, em que compostos ativos interagem simultaneamente e sua ação pode complementar ou prejudicar os outros ou neutralizar seus possíveis efeitos negativos. Também possuem ação de prevenção, onde alguns componentes da planta têm a capacidade de inibir a aparência de algumas doenças (Hassan, 2013). Campagnolo et al. (2013) destacam que essas substâncias influenciam na microbiota intestinal, onde podem melhorar a digestibilidade e a absorção dos nutrientes, e consequentemente, aperfeiçoar a resposta imune dos animais.

Dentre várias plantas fornecedoras de óleos essenciais, *Mentha piperita* é popularmente conhecida como hortelã pimenta ou menta, comumente destinada para uso medicinal e alimentício (Lorenzi e Matos, 2002). É também reconhecida por possuir efeitos benéficos no tecido gastrointestinal, ações imunomoduladoras e potencial quimiopreventivo (Mckay e Blumberg, 2006; Valladão et al., 2017).

As investigações da atividade antimicrobiana das plantas do gênero *Mentha* tem recaído na ação dos seus óleos essenciais, por vários estudos (Mckay e Blumberg, 2006; Shayegh et al., 2008; Rasooli et al., 2008; ISCAN et al., 2002; Lawrence, 2006; Alvarenga et al., 2007; Al-Bayati, 2009; Sarac et al., 2009), confirmando a ação antimicrobiana de diversas espécies, até mesmo contra bactérias geralmente resistentes a antibióticos convencionais. Estes estudos normalmente mostram melhor ação dos óleos essenciais contra bactérias gram positivas, as quais são frequentemente mais suscetíveis à inibição por óleos essenciais do que as gram negativas, em razão destas últimas apresentarem membrana externa hidrofílica que bloqueia a penetração dos óleos essenciais hidrofóbicos até à membrana celular (Al-Bayati, 2009).

Os óleos essenciais dilatam os vasos sanguíneos periféricos e inibem as bactérias, especialmente o mentol, que possui atividade antibacteriana de vasto espectro, sendo as bactérias gram positivas e negativas suscetíveis a este princípio ativo (Pattnaik et al., 1997).

Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a influência da suplementação dietética com óleo essencial de *M. piperita* sobre o desempenho zootécnico e parâmetros hemato-imunológicos e resistência ao desafio com *S. agalactiae* em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Obtenção e composição dos óleos essenciais*

A planta foi cultivada no Setor de Plantas Medicinais da EMBRAPA Amazônia Ocidental, situada em Manaus, Estado do Amazonas, Brasil (03°06'23.04"S, 60°01'35.14"W), onde a altitude media é de 50 m acima do nível do mar e a temperatura média do ar é de 25,6 °C, com precipitação de anual de 2.200 mm. As plantas foram colhidas de manhã e as folhas processadas no Laboratório de Fitoquímica e Plantas Medicinais da EMBRAPA Amazônia Ocidental, Manaus, Brasil.

A extração foi realizada pelo processo de hidrodestilação (Majolo et al., 2016) a partir de folhas de *M. piperita*, com auxílio do aparelho tipo Clevenger modificado e acondicionado refrigerado, em frascos de vidro âmbar, até o preparo das rações. Em resumo, o método consiste em colocar 500 g de folhas frescas de hortelã-pimenta em um frasco com volume de 1.200 mL, adicionando-se água até cobrir o material e ativar a manta aquecedora. Após duas horas de extração, o óleo essencial é coletado, acondicionado em frascos de vidro âmbar e estocado a -18 °C.

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

## 2.2 Mínima Concentração Inibitória (MIC)

Foi determinada a mínima concentração inibitória do óleo essencial sobre as bactérias *Streptococcus agalactiae* (S13 - DDBJ/EMBL/GenBank public databases under accession number CP018623, Facimoto et al. 2017) e *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966). As bactérias foram cultivadas em caldo de cérebro e coração (BHI Himedia® do inglês “Brain Heart Infusion”), estriadas em placas de Petri contendo Ágar Triptona de Soja (TSA Himedia® do inglês “Tryptic Soy Agar”) incubadas a 28°C por 24 h, e posteriormente transferidas para tubos de ensaio contendo BHI (Himedia® do inglês “Brain Heart Infusion”). Os ensaios foram realizados em triplicata, com controle positivo, negativo e de álcool de cereais. O controle positivo de crescimento foi o meio de cultura inoculado com os microrganismos, o negativo o meio de cultura não inoculado e o de álcool de cereais sendo meio de cultura inoculado com os microrganismos na presença de álcool de cereais nos poços. Em uma microplaca de 96 poços, foram feitas as diluições seriadas do óleo essencial na solução estoque a 4% em meio de cultura Luria-Bertani (LB). Os inóculos bacterianos (20 µL) com 1 x 10<sup>3</sup> Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de peso corporal, foram colocados nos poços da microplaca e incubados a 35 °C por 24 h. Depois disso, determinou-se o MIC, menor concentração capaz de inibir o crescimento das bactérias.

### 2.3 Material biológico e desenho experimental

Foram utilizadas 300 tilápias-do-nilo, com peso médio inicial de 5 g, provenientes da Piscicultura Pomerode, localizada na cidade de Pomerode. Os animais foram transportados para o Laboratório AQUOS-Sanidade de Organismos Aquáticos onde foi realizada a biometria dos animais (comprimento total e peso), foram aclimatados por 7 dias e alimentados com ração comercial extrusada comercial supra® contendo 40 % de proteína bruta. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 20 tanques circulares com capacidade para 100 L em sistema de recirculação do tipo semi-aberto, com filtragem mecânica, biológica (anaeróbio e aeróbio) e desinfecção ultravioleta. Os parâmetros de qualidade da água foram medidos diariamente com equipamento multiparâmetro Hanna® HI-9829 (Hanna Instruments Brasil, Barueri, SP) e as concentrações de amônia total e nitrito foram medidas a cada 3 dias por teste colorimétrico (Alfakit®, Florianópolis, SC). Durante o período experimental, a temperatura da água foi de  $27,35 \pm 1,31$  °C, oxigênio dissolvido  $5,28 \pm 0,84$  mg L<sup>-1</sup>, pH  $6,10 \pm 0,92$ , salinidade  $0,49 \pm 0,01\%$ , amônia total  $1,75 \pm 1,88$  mg L<sup>-1</sup>, nitrito  $0,33 \pm 0,12$  mg L<sup>-1</sup>.

Um total de 300 peixes foram divididos nos 20 tanques em delineamento inteiramente casualizado com 15 peixes cada e alimentados com ração Controle, Controle ração + álcool e ração suplementada com o óleo essencial nas concentrações de *Mentha* 0,075; *Mentha* 0,125; *Mentha* 0,25% durante 50 dias, em quadruplicata. As concentrações foram escolhidas a partir do MIC. Decorridos 50 dias de alimentação suplementada, foram amostrados quatro peixes de cada tanque para realização de análises hemato-imunológicas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC Nº 5427100816).

### 2.4 Preparo das dietas experimentais

O procedimento de inclusão do óleo essencial na ração foi baseado em Dairiki et al. (2013), utilizando-se álcool de cereais como veículo de incorporação. Para isso, utilizou-se a mesma ração fornecida durante o período de aclimatação. Para cada quilograma de ração, foram aspergidos 100 mL de álcool de cereais contendo óleo essencial nas concentrações desejadas (*Mentha* 0,075%, *Mentha* 0,125% e *Mentha* 0,25%). Na ração com álcool aspergiu-se somente álcool de cereais (Controle ração+álcool), enquanto que no Controle não houve aspersão, apenas o fornecimento da ração comercial. Esse procedimento de aspersão foi

realizado semanalmente. Em seguida, a ração permaneceu secando durante 24 h a 25 °C e posteriormente embalada e armazenada a -18°C até o momento da alimentação.

### *2.5 Alimentação e biometria*

A alimentação suplementada foi oferecida por um período de 50 dias e arraçoamento em função do ganho de peso dos peixes, quatro vezes por dia. Foram realizadas biometrias quinzenais para determinar a biomassa de cada tanque, ajustando a quantidade de ração de acordo com o crescimento dos peixes.

### *2.6 Análise hematológica*

Foram amostrados 4 peixes por unidade experimental após anestesia com eugenol ( $75 \text{ mg L}^{-1}$ ), para coleta do sangue por punção do vaso caudal, com seringa de 3 mL contendo EDTA 10%. Foram preparadas, em duplicata, extensões sanguíneas para posterior coloração com May-Grunwald/Giemsa/Wright, para as contagens totais de trombócitos, leucócitos e contagem diferencial de leucócitos. Com uma alíquota do sangue, determinou-se o percentual de hematocrito e índices hematimétricos (Ranzani-Paiva et al., 2013). A contagem total de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer, após diluição (1:200) em fluido de Dacie. Os números totais de trombócitos e leucócitos no sangue foram aferidos pelo método indireto, a partir das extensões sanguíneas (Ishikawa et al., 2008).

### *2.7 Obtenção de plasma para análises imunológicas*

O sangue coletado pelo procedimento descrito acima foi acondicionado em tubos de ensaio estéreis e armazenado a 4 °C *overnight* para coagulação, sendo posteriormente centrifugado a 1.400 g por 10 min. O plasma foi aliquotado com auxílio de micropipeta e armazenado a -20 °C para análises imunológicas.

### *2.8 Atividade antimicrobiana do plasma*

Determinou-se a atividade antimicrobiana do plasma contra *S. agalactiae* em microplacas de 96 poços com fundo chato, conforme a metodologia utilizada por Silva et al. (2009). Os inóculos bacterianos foram preparados na concentração de 0,5 na escala de Macfarland e diluídos em meio de cultura pobre, do inglês *poor broth* (PB), 100.000 vezes. Então, 150 µL de PB foram adicionados ao 1º poço da linha, 100

$\mu\text{L}$  aos demais poços e 50  $\mu\text{L}$  do plasma adicionado ao primeiro poço da linha. Posteriormente, foi realizada diluição seriada de fator 1:2 até o 12º poço. Finalmente, 20  $\mu\text{L}$  da bactéria foram adicionados a cada poço da amostra diluída do plasma e do controle positivo. Para controle negativo, utilizou-se solução salina diluída em PB. As microplacas foram incubadas a 28 °C por 24 h. O crescimento dos microrganismos foi determinado em leitora de microplaca, no comprimento de onda de 550 nm. A atividade antimicrobiana do plasma é recíproca a última diluição que apresentar atividade bactericida, ou seja, inibição total da bactéria.

### 2.9 Atividade aglutinante do plasma

Os títulos de aglutinação foram obtidos segundo Silva et al. (2009) para *Steptococcus agalactiae*. A bactéria foi cultivada e inativada em formalina tamponada 10%. O teste foi realizado em microplaca de fundo “U”, onde o plasma foi diluído na proporção de 1:1 em solução tampão fosfato salino (PBS 1) do primeiro ao 12º poço. Após esse procedimento, 50  $\mu\text{L}$  da bactéria inativada (*Steptococcus agalactiae*) foi adicionada em todos os poços na densidade óptica de aproximadamente 0,4 na escala de Macfarland em 550 nm. A microplaca foi incubada a 25°C por 18 h em câmara úmida. A aglutinação foi confirmada visualmente observando um concentrado aglutinante no fundo do poço. O título de aglutinante foi considerado recíproco ao último poço que apresentou aglutinação.

### 2.10 Imunoglobulina total

A proteína total do plasma sanguíneo foi mensurada com kit “Proteínas Totais” (Labtest, Belo Horizonte, MG). A concentração de imunoglobulina total foi mensurada de acordo com o método descrito por Amar et al. (2000), onde misturou-se 50  $\mu\text{L}$  do plasma com 50  $\mu\text{L}$  de solução de polyethylene glycol (Sigma-Aldrich, EUA) 12% e a mistura incubada à temperatura ambiente por duas horas, a fim de precipitar as moléculas de imunoglobulina. O precipitado de imunoglobulina foi removido por centrifugação (5000 g a 4°C por 10 min) e o sobrenadante retirado e mensurado a quantidade de proteína total também pelo kit, utilizando-se albumina bovina para confecção da curva padrão. A concentração de imunoglobulina total está expressa em mg.mL<sup>-1</sup>, sendo calculada pela formula:

$$\text{Total Ig} = \text{proteína total do plasma} - \text{proteína tratada com PEG (mg mL}^{-1}\text{)}$$

## 2.11 Avaliação dos parâmetros de desempenho zootécnico

O ganho de peso, a taxa de crescimento específico (TCE) e a eficiência alimentar (EA) foram calculadas conforme Fu et al. (1998) pelas seguintes equações:

$$\text{Ganho de peso} = \text{Peso inicial} - \text{Peso final (g)}$$

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

$$\text{EA} = 100 \times (\text{Peso inicial (g)} - \text{Peso final (g)}) / \text{Consumo de ração (g)}$$

## 2.12 Desafio com *Streptococcus agalactiae*

Ao final do período de alimentação, os animais foram submetidos à condição de estresse por diminuição do nível de água a fim de promover situação de anóxia nos peixes e gradativo aumento de temperatura, iniciando desafio em 28 °C, após breve anestesia com eugenol (75 mg L<sup>-1</sup>). Para o desafio foi utilizado 1 x 10<sup>7</sup> Unidades Formadoras de Colônia (UFC) mL<sup>-1</sup>, via injeção intraperitoneal (i.p.), onde cada indivíduo recebeu 100 µL de solução bacteriana. Para isto, o inóculo crescido em meio de cultura caldo de cérebro e coração (BHI Himedia® do inglês “Brain Heart Infusion”), por 24 h em 30 °C, foi centrifugado 30 min a 1800 g. O sobrenadante foi descartado e o pelete ressuspensionado em solução salina estéril 0,65% na proporção para que a suspensão se mantivesse em 1 x 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, segundo a curva de crescimento ralizada previamente. Após a infecção, os peixes foram observados por 7 dias para obtenção da taxa de mortalidade, cálculo da porcentagem dos mortos. Também foi aferida a taxa de mortalidade cumulativa, calculada por meio da retirada e contagem diária cumulativa dos peixes mortos de cada unidade experimental. Durante esse período, foram analisados os sinais clínicos de estreptococose nos peixes. Os animais mortos foram imediatamente removidos do tanque. Após a semana de desafio experimental os peixes foram anestesiados e eutanasiados por concussão cerebral (CEUA/UFSC Nº 5427100816) e posteriormente utilizados para confirmar a infecção, através do postulado de Koch, onde fragmentos dos órgãos internos foram coletados assepticamente para reisolamento da bactéria a fim de confirmar o quadro doença nos peixes. As amostras foram colocadas em tubos contendo meio líquido BHI (HiMedia, Mumbai, India) para crescimento. Posteriormente, o conteúdo foi plaqueado em meio ágar triptona de soja (HiMedia) enriquecido com 5% de sangue de carneiro

desfibrinado e as placas foram incubadas a 28 °C por 12 h para visualização e caracterização das colônias de *S. agalactiae*.

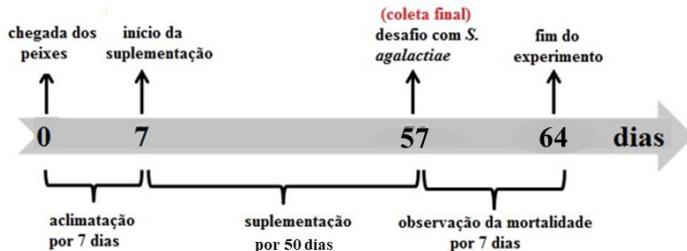


Figura 1: Desenho esquemático dos procedimentos ao longo do período experimental.

### 2.13 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos a ANOVA de uma via ( $p<0,05$ ). Para verificar a homocedasticidade foi utilizado o teste de Levene e a normalidade o teste de Shapiro Wilk. Quando diferenças significativas foram encontradas na análise de variância, o teste de Tukey de separação das médias foi aplicado através do software Statistica 7.0. Os dados experimentais de mortalidade do desafio foram analisados por Kaplan-Meier.

## 3. Resultados

### 3.1. Composição dos óleos essenciais

Na composição do óleo essencial de *M. piperita* destacam-se as concentrações dos componentes mentol (33,8%), mentona (15,2%), acetado de mentila (13,0%) e pulegona (8,3%) (Tabela 1).

**Tabela 1**

Composição do óleo essencial de *Mentha piperita* (%) n.i = compostos não identificados.

<b>Componentes</b>	<b>Teor (%)</b>
α-pineno	1,0
Canfeno	1,3
Sabineno	0,2
β-pineno	1,2
6-metil-5-hepten-2-ona	0,2
Mirceno	1,3
p-cimeno	0,3
Limoneno	4,7
1,8-cineol	2,8
γ-terpineno	0,1
Linalol	0,2
iso-pulegol	0,1
Mentona	15,2
Mentofurano	6,2
Mentol	33,8
terpinen-4-ol	1,3
iso-mentol	0,2
α-terpineol	0,3
Pulegona	8,3
Neral	1,3
Piperitona	1,6
Geraniale	1,1
acetato de <i>neo</i> -mentila	0,9
acetato de mentila	13,0
n.i.	0,2
n.i.	0,4
n.i.	0,2
(E)-cariofileno	0,4
ar-curcumeno	0,6
α-zingibereno	0,4
β-bisaboleno	0,5
β-sesquifelandreno	0,4
óxido de cariofileno	0,3
n.i.	0,2
Total identificado	99,1

### 3.2. Mínima concentração inibitória (MIC)

Os resultados apontam que o óleo essencial testado foi ativo contra as bactérias *S. agalactiae* e *A. hydrophila*, com valores de MIC de respectivamente 0,125% e 0,065% (Tabela 2). O controle com álcool de cereais também inibiu o crescimento das cepas em 0,25%.

**Tabela 2**

Mínima concentração inibitória (MIC) do óleo essencial de *Mentha piperita* contra duas espécies de bactérias patogênicas: *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*.

Bactérias	MIC (mg L <sup>-1</sup> )
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,125 ± 0,81 <sup>b</sup>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,0625 ± 0,01 <sup>a</sup>
Álcool de cereais + <i>A. hydrophila</i>	0,253 ± 0,01 <sup>c</sup>
Álcool de cereais + <i>S. agalactiae</i>	0,253 ± 0,01 <sup>c</sup>

### 3.3. Desempenho zootécnico

Após o período de alimentação de 50 dias não houve diferença significativa entre os animais suplementados com o óleo essencial e os animais não suplementados (Tabela 3).

**Tabela 3**

Parâmetros de desempenho zootécnico (media ± desvio padrão) de tilápias-donilo após 50 dias de suplementação com óleo essencial de hortelã (*Mentha piperita*) em diferentes concentrações (0,075%; 0,125%; 0,25%), Controle e Controle <sub>ração+álcool</sub>. TCE = taxa de crescimento específico, EA= fator de conversão alimentar. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tratamentos	Peso (g)	Comprimento (cm)	Ganho de peso (%)	TCE (%)	EA
Controle	59,08 ±4,97	11,75 ± 0,36	12,82±1,25	5,09 ±0,19	43,23±0,06
Controle <sub>ração+álcool</sub>	61,37 ± 6,54	11,82± 0,54	13,01±2,01	5,11 ±0,32	43,05±0,05
<i>Mentha</i> 0,075%	59,71 ±7,92	11,69± 0,57	12,64±1,87	5,06 ±0,30	40,01±0,05
<i>Mentha</i> 0,125%	61,29 ± 8,36	11,64± 0,57	13,35±2,60	5,17 ±0,28	47,01±0,08
<i>Mentha</i> 0,25%	69,87± 6,54	12,07 ± 0,40	13,64±2,46	5,20 ±0,36	41,06±0,09

### 3.4. Parâmetros hematológicos

Não houve diferença significativa entre quase todos os tratamentos e o controle, exceto para proteína do plasma nos animais suplementados com *Mentha* 0,25% ( $5,23 \pm 0,28 \text{ g dL}^{-1}$ ) quando comparado com Controle <sub>ração+álcool</sub>. O VCM apresentou diferença significativa entre os animais suplementados com *Mentha* 0,125% ( $172,90 \pm 12,02 \text{ fL}$ ) e *Mentha* 0,25% ( $138,68 \pm 6,79 \text{ fL}$ ) (Tabela 4). Para os leucócitos totais os maiores valores foram obtidos nos peixes suplementados com *Mentha* 0,25% ( $131,88 \pm 1,96 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) e *Mentha* 0,125% ( $95,22 \pm 1,53 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ). Por outro lado, os menores valores de trombócitos totais ocorreram nos peixes suplementados com Controle <sub>ração+álcool</sub> ( $5,69 \pm 3,87 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ).

**Tabela 4**

Parâmetros hematológicos (média ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo após 50 dias de suplementação com óleo essencial de hortelã (*Mentha piperita*) em diferentes concentrações (0,075%; 0,125%; 0,25%), Controle e Controle <sub>ração+álcool</sub>. VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, HCM = proteína plasmática total. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

Parâmetros	Controle	Controle <sub>ração+álcool</sub>	<i>Mentha</i> 0,075%	<i>Mentha</i> 0,125%	<i>Mentha</i> 0,25%
Proteína (g dL <sup>-1</sup> )	$5,28 \pm 0,24^a$	$4,78 \pm 0,17^b$	$4,97 \pm 0,09^{ab}$	$5,18 \pm 0,15^{ab}$	$5,23 \pm 0,28^a$
Eritrócitos ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	$2,00 \pm 0,47$	$2,19 \pm 0,23$	$2,04 \pm 0,30$	$1,90 \pm 0,40$	$2,62 \pm 0,15$
Hematórito (%)	$32,37 \pm 8,17$	$32,43 \pm 1,25$	$29,94 \pm 0,81$	$32,75 \pm 1,59$	$36,37 \pm 0,75$
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	$7,87 \pm 1,91$	$7,82 \pm 0,17$	$7,67 \pm 0,08$	$7,78 \pm 0,15$	$8,60 \pm 0,75$
VCM (fL)	$160,49 \pm 7,14^{ab}$	$149,20 \pm 23,04^{ab}$	$145,49 \pm 10,61^{ab}$	$172,90 \pm 12,02^a$	$138,68 \pm 6,79^b$
HCM (pg)	$39,20 \pm 2,25$	$35,78 \pm 6,06$	$37,80 \pm 1,99$	$41,43 \pm 7,57$	$32,77 \pm 2,55$
CHCM (g gL <sup>-1</sup> )	$24,46 \pm 1,76$	$24,04 \pm 1,40$	$26,16 \pm 3,37$	$23,82 \pm 2,76$	$23,63 \pm 1,47$
Leucócitos Totais ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	$101,87 \pm 6,7^{ab}$	$109,63 \pm 1,37^{ab}$	$102,62 \pm 3,18^{ab}$	$95,22 \pm 1,53^b$	$131,88 \pm 1,96^a$
Trombócitos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	$10,75 \pm 1,44^{ab}$	$5,69 \pm 3,87^b$	$10,31 \pm 1,92^{ab}$	$10,81 \pm 2,13^{ab}$	$11,69 \pm 2,05^a$
Linfócitos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	$81,12 \pm 2,74$	$70,50 \pm 2,0$	$81,81 \pm 8,9$	$81,94 \pm 2,3$	$77,81 \pm 5,82$
Neutrófilos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	$7,87 \pm 0,43$	$6,43 \pm 1,37$	$6,75 \pm 3,18$	$6,44 \pm 1,53$	$6,37 \pm 1,96$
Monócitos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	$12,12 \pm 1,29$	$17,62 \pm 3,75$	$11,5 \pm 6,14$	$11,37 \pm 5,57$	$16,31 \pm 4,62$

### 3.5. Parâmetros imunológicos

Com relação às concentrações de imunoglobulinas, título de aglutinação e antimicrobiano, não houve diferença significativa entre os tratamentos e os animais controle, exceto para proteína total do plasma que apresentou significativa diferença entre Controle <sub>ração+álcool</sub> ( $61,46 \pm 6,76 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e *Mentha* <sub>0,125%</sub> ( $40,84 \pm 7,75 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5**

Parâmetros imunológicos do plasma (media ± desvio padrão) de tilápias-do-nilo após 50 dias de suplementação com óleo essencial de hortelã (*Mentha piperita*) em diferentes concentrações (0,075%; 0,125%; 0,25%), Controle e Controle <sub>ração+álcool</sub>. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ). Ig: imunoglobulinas.

Tratamentos	Proteína total do plasma (mg mL <sup>-1</sup> )	Ig (mg mL <sup>-1</sup> )	Título de aglutinação (log <sub>2</sub> (x+1))	Antimicrobiano (log <sub>2</sub> (x+1))
Controle	$51,37 \pm 5,88^{\text{ab}}$	$28,01 \pm 9,12$	$0,71 \pm 0,20$	$9,00 \pm 0,00$
Controle <sub>ração+álcool</sub>	$61,46 \pm 6,76^{\text{a}}$	$29,79 \pm 4,91$	$0,71 \pm 0,20$	$9,00 \pm 0,00$
<i>Mentha</i> <sub>0,075%</sub>	$49,45 \pm 4,68^{\text{ab}}$	$24,40 \pm 2,07$	$0,70 \pm 0,00$	$8,67 \pm 0,67$
<i>Mentha</i> <sub>0,125%</sub>	$40,84 \pm 7,75^{\text{b}}$	$19,36 \pm 3,42$	$0,70 \pm 0,00$	$8,33 \pm 1,52$
<i>Mentha</i> <sub>0,25%</sub>	$55,91 \pm 4,19^{\text{ab}}$	$28,12 \pm 2,47$	$0,63 \pm 0,13$	$8,67 \pm 0,67$

### 3.6. Mortalidade após o desafio

Após o desafio experimental, os peixes de todos os tratamentos mostraram os sinais clínicos típicos da infecção por *S. agalactiae*, como natação errática, exoftalmia junto a opacidade de córnea e/ou hemorragia, ulceração da epiderme, ascite, manchas e petéquias na superfície do corpo, anorexia e morte (Salvador et al., 2003; Chen et al., 2012). Os animais não perderam o apetite até 24 h após a infecção experimental. Nos dias subsequentes os peixes dos grupos Controle e Controle <sub>ração+álcool</sub> cessaram a alimentação e os suplementados diminuíram, deixando sobras nas unidades experimentais após o arraçoamento.

Conforme mostrado na Fig. 1, a sobrevivência foi elevada nos peixes com dieta suplementada. *O. niloticus* alimentados com *Mentha* <sub>0,25%</sub> apresentaram significativamente maior sobrevivência após desafio experimental do que peixes alimentados com outras dietas. Peixes do grupo Controle, Controle <sub>ração+álcool</sub> e tratamento com *Mentha* <sub>0,125%</sub> apresentaram mortalidade semelhante.

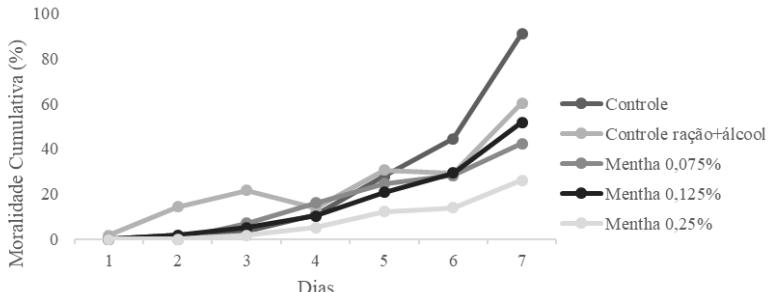


Figura 2: Mortalidade cumulativa de *Oreochromis niloticus* alimentada com dietas contendo diferentes concentrações de *Mentha piperita* (0,075%; 0,125%; 0,25%), Controle e Controle ração+álcool, após desafio experimental com *Streptococcus agalactiae*.

Houve diferenças significativas na mortalidade entre *Mentha* 0,25% e todos os outros tratamentos ( $p = 0,0001$ ). Não houve diferenças significativas entre Controle, Controle ração+álcool e *Mentha* 0,125% ( $p = 0,2911$ ). O tratamento com *Mentha* 0,075% apresentou sobrevida significativamente maior ( $p = 0,0469$ ) do que *Mentha* 0,125%, embora menor que com o tratamento *Mentha* 0,25%, que apresentou a maior sobrevida (Fig. 1). A concentração crescente de *Mentha* teve efeitos positivos na resistência dos peixes ao *Streptococcus agalactiae*. A bactéria *S. agalactiae* foi reisolada das amostras de órgãos internos, confirmando o postulado de Koch.

#### 4. Discussão

Assim como o relatado por outros autores (Loewenfeld e Back, 1980; Valmorbida et al., 2006; David et al., 2007), o mentol foi o principal componente no óleo essencial de *M. piperita* neste estudo. Pinto (2010) relataram que pulegona e a mentona são componentes majoritários do gênero *Mentha*, os quais junto ao mentol e o acetato de metila foram os componentes encontrados em maiores concentrações no óleo essencial aplicado nesse estudo. Vários autores destacam os mesmos componentes (mentol, mentona, acetado de mentila) exibindo maiores concentrações no óleo essencial de hortelã (Diwivedi et al., 2004; McKay e Blumberg, 2006; Sokovic et al., 2009). A pulegona é um composto orgânico de ocorrência natural rotineiramente encontrado no óleo essencial das espécies de *Mentha*, usado como aromatizante em perfumaria e aromaterapia (Kumar et al., 2011). Em grande quantidade

pode ser tóxica, causando danos no fígado, além de apresentar propriedade antiparasitária (Harrewijn et al., 2001). Já a mentona possui ação digestiva e não é toxico (Pinto, 2010). Esses resultados ratificam outros estudos, que mostram os terpenos como responsáveis pela propriedade antibacteriana (Karaman et al., 2003).

O gênero *Mentha* demonstrou diversidade dos seus constituintes químicos, por exemplo: mentona (Teixeira et al., 2012), mentol (Marzouk et al., 2008), piperonal (Zwaving e Smith, 1971), piperitenona (Kokkini et al., 2002) e isomentona (Baser et al., 1999). Tais variações ocorrem devido à fatores ambientais (Beghidja et al., 2007; Brada et al., 2007; Hussain et al., 2010; Kumar et al., 2011; Baser et al., 2012; Sitzmann et al., 2014; Kasrati et al., 2015), como possível explicação pode-se destacar a colheita, estações ou condições de crescimento (Boukhebti et al., 2011). Esses fatores alteram a composição dos óleos essenciais e suas propriedades químicas, bem como sua ação nos animais (Pinto, 2010).

Percebe-se que a ação antibacteriana observada no óleo essencial para ambas bactérias pode ser de responsabilidade dos compostos majoritários como mentol, mentona e pulegona, os quais atribuiu-se ação em vários estudos para pulegona (Oumzil et al., 2002), mentol (Sivropoulou et al., 2002), mentona (Mahady et al., 2005). Furahata et al. (2003) e Iscan et al. (2002) comparando mentol e mentona atribuíram a ação antimicrobiana como responsabilidade do mentol, composto em maior concentração nesse trabalho.

As bactérias gram positivas são mais suscetíveis do que as gram negativas quanto a atividade antimicrobiana dos os óleos essenciais (Pessoa et al., 2005; Sarrazin et al., 2012). Porém, resultados contrários foram encontrados nesse estudo, provavelmente em razão da dificuldade de ação do óleo junto a capsula polisacarídica presente em *S. agalactiae* (Pluddemann et al., 2006). Similarmente, suscetibilidade da eficiência dos antimicrobianos de acordo com a classificação de Gram também não foi verificada por Ushimaru et al. (2007), avaliando extratos metanólicos de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) e alho (*Allium sativum* L.) sobre *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* sp. constatando que o extrato metanólico de cravo-da-índia (95mg mL<sup>-1</sup>) foi mais efetivo sobre bactérias Gram positivas e alho (133 mg mL<sup>-1</sup>) mais eficaz contra bactérias Gram negativas. Valeriano et al. (2012), comparando a ação antibacteriana do óleo essencial de *M. piperita* contra bactérias Gram positivas e gram negativas observaram maior atividade para as Gram positivas, seguindo a ordem crescente

seguinte: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter sakazakii* e *Listeria monocytogenes*.

Condições de alto adensamento e baixa qualidade da água incitam a liberação de cortisol, levando os peixes a um quadro de estresse. Organismos estressados apresentam anorexia, esgotamento de reservas de glicogênio e imunossupressão, desfavorecendo a resistência aos patógenos (Evans et al. 2002, Oba et al. 2009). Por essa razão os animais foram induzidos a anóxia antes da infecção experimental. Após 48 h do desafio a mortalidade teve início, e tal fato pode ser atribuído a particularidade da ação da cepa utilizada ou a temperatura do ambiente de 28 °C. A severidade das enfermidades em tilápias possui relação com a cepa de *S. agalactiae* usada, dose infectante, temperatura da água, biomassa e manejo zootécnico (Chang e Plumb 1996). Kayansamruaj et al. (2014) constataram que tilápias infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e mantidas a 35 °C apresentaram mortalidades de 85%, enquanto que as mantidas a 28 °C apresentaram 45%. Os peixes não suplementados apresentaram as maiores mortalidades, evidenciando melhor resposta a infecção dos animais alimentados com dieta suplementada. O aumento da sobrevivência após administração de óleos essências na alimentação de tilápias-do-nilo também foi relatado em outros estudos utilizando casca de laranja (*Citrus sinensis*) contra *S. iniae* (Acar et al., 2015), canela (*Cinnamomum verum*) reduzindo a mortalidade após infecção com *S. iniae* e óleo de cravo (*Syzgium aromaticum*) mostrando resultados semelhantes em tilapia após desafio com *Lactococcus garvieae* (Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn, 2009, 2010). *Mentha piperita* também promoveu maior sobrevida (40 e 60%) nos maiores níveis de suplementação (0,3 e 0,4%) para infecção de *Lates calcarifer* com *Vibrio harveyi* (Talpur, 2014). No presente estudo, o isolado provocou a enfermidade nos peixes, o que foi confirmado pelos sinais clínicos característicos observados em todos os animais e pelo postulado de Koch. A suplementação com *M. piperita* foi capaz de manter o consumo de alimento dos animais dentro da normalidade no primeiro dia após o desafio, ao contrário dos animais não suplementados. Este fato talvez seja explicado pela elevada concentração de bactérias patogênicas administradas intraperitonealmente ( $1 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup> peso vivo) em animais com dieta sem inclusão de óleo essencial.

A presença, quantidade e proporção das células no sangue periférico representam o estado fisiológico do animal, exibindo ampla variação em função de fatores externos e internos (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004). Os valores do percentual de hematócrito não

ultrapassaram os valores de referência (Tavares-Dias et al., 2009), porém foram observados valores elevados em todos os peixes suplementados e não suplementados, *Mentha* 0% ( $32,37 \pm 8,17\%$ ), *Mentha* 0%+álcool ( $32,43 \pm 1,25\%$ ), *Mentha* 0,075% ( $29,94 \pm 0,81\%$ ), *Mentha* 0,125% ( $32,75 \pm 1,59\%$ ) e *Mentha* 0,25% ( $36,37 \pm 0,75\%$ ), principalmente na maior concentração de suplementação com *Mentha* 0,25%. O mesmo foi mostrado na inclusão de gengibre para trutas arco-íris (*O. mykiss*) (Nya e Austin, 2009), robalo asiático (*Lates calcarifer*) (Talpur et al., 2013) e esturjão (*H. huso*) (Kanani et al., 2014), assim como Adel et al. (2016) que encontraram valores de hematócrito mais elevados na maior concentração de extrato de *M. piperita* suplementado na dieta. O percentual de hematócrito em peixes variam entre 20 e 45% e para sua interpretação é necessário ponderar que peixes mais ativos podem exibir valores maiores de hematócrito, devido a demanda de oxigênio ser maior (Hrubec e Smith, 2010). O hematócrito consiste em um índice muito utilizado para evidenciar efeitos de fatores ambientais sobre os peixes, por apresentar o menor coeficiente de variação nestes animais (Tavares-Dias e Faustino, 1998).

*Mentha piperita* é fonte de minerais como o potássio, cálcio, ferro, manganês e magnésio, também é rico em vitaminas, incluindo vitamina A, betacaroteno, vitamina C e vitamina E (Rita e Datta, 2011). Possivelmente o modo de ação do extrato da planta sobre os índices hematológicos pode-se dar em razão do efeito da vitamina C no aumento da absorção de ferro no intestino do peixe e outras vitaminas e minerais que auxiliam em melhorias na hematopoiese (Lim et al., 2000; Sharifzadeh et al., 2015).

O número total de leucócitos foi maior nos animais suplementados com *Mentha* 0,25% do que nos suplementados com *Mentha* 0,125%. Similarmente, o número total de trombócitos também foi maior nos peixes suplementados com *Mentha* 0,25% quando comparado aos não suplementados *Mentha* 0%+álcool. Observa-se que a suplementação com *Mentha* 0,25% apresentou alterações significativas de aumento no número de leucócitos totais e trombócitos totais circulantes, possivelmente proporcionando aos animais uma resposta inata celular mais preparada. A administração oral de imunoestimulante foi descrita provocando melhorias no sistema imune inato por meio de melhora na atividade leucocitária e proteção contra enfermidades (Sakai, 1999). Vários estudos confirmaram melhoria nos parâmetros imunes inatos depois da administração de plantas medicinais como imunoestimulantes

(Dugenci et al.,2003; Reverter et al., 2014; Harikrishnan et al.,2015; Van Hai, 2015; Vallejos-Vidal et al.,2016).

Com relação aos parâmetros imunológicos do plasma, não houve diferença significativa, exceto na proteína total do plasma. A proteína total do plasma consiste em importante variável imune inespecífica (Magnadóttir, 2006). Tais alterações da concentração de proteína total do plasma são causadas principalmente por mudanças no volume plasmático, assim, qualquer estresse que induza esta situação pode alterar os valores de proteína total (Melo et al., 2009). O aumento no percentual de hematócrito pode explicar as alterações no volume do plasma. A semelhança dos peixes suplementados e os não suplementados sugere que a suplementação com óleo essencial não comprometeu o equilíbrio osmótico do plasma. A aglutinação de patógenos é mediada principalmente por imunoglobulinas (Swain et al., 2006). Portanto, a capacidade de aglutinação manteve-se inalterada entre os animais porque não houve diferença na concentração de imunoglobulinas.

Não foram encontradas diferenças significativas no desempenho zootécnico dos peixes, situação já elucidada por outros autores que observaram níveis distintos de óleos essenciais e similares aos utilizados neste estudo não promovendo efeito no crescimento para alevinos de tilápia-do-nilo (Zheng et al., 2009; Navarrete et al. 2010; Campagnolo et al. 2013; Villeda, 2013; Baba et al., 2016). A possível explicação para inclusão de óleos essenciais não promoverem melhor desempenho zootécnico nestes casos pode ter sido o emprego de pequenas dosagens de óleos nas dietas, já que seu efeito é dose-dependente conforme relatado por Harikrishnan et al. (2011).

Em conclusão, a suplementação com óleo essencial de *Mentha* 0,25%, quando comparado às concentrações de *Mentha* 0,075%, *Mentha* 0,125% e controles promoveu maior sobrevivência após o desafio. O óleo essencial de *M. piperita* aumentou a resistência contra *S. agalactiae*, patógeno responsável por grandes perdas na tilapicultura. Entretanto, estudos devem ser feitos com concentrações maiores e intermediárias para determinar sua melhor ação.

## 5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Mestrado à L.T.S. Silva, à bolsa de Produtividade em Pesquisa à M.L. Martins (CNPq 305869/2014-0) e J.L.P. Mourão (308292/2014-6).

## 6 Referências

- Acar U, SabriKesbiç O, Sevdan Y, Gültepe N, Türker A (2015) Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. Aquaculture 437: 282-286.
- Adel M, Pourgholam R, Zorriehzahra J, Ghiasi M (2016) Hemato-Immunological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*. Fish & Shellfish Immunol 55: 267-273.
- Abutbul S, Golan-Goldhirsh A, Barazani O, Zilberg D (2014) Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis sp.*) Aquaculture 238: 97-105.
- Adams RP (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. 4th ed. Allured Publishing Co, Carol Stream, Illinois.
- Alvarenga AL, Schwan RF, Dias DR, Schwan-Estrada KRF, Bravo-Martins CEC (2007) Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. Rev Bras PI Med 9 (4): 86-91.
- Al-Bayati FA (2009) Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. Ann Clin Microbiol Antimicrob 8: 20.
- Amar EC, Kiron V, Satoh S, Okamoto N, Watanabe T (2000) Effect of dietary β-carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish Sci 66: 1068-1075.
- Awaad AS (2009) Flavonoids of *Bidens bipinnata* and their antioxidant activity. J King Saud Univ 21: 183-189.
- Awad E, Awaad A (2017) Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. Fish & Shellfish Immunol 67: 40-54.
- Baba E, Acar Ü, Öntaş C, Kesbiç OS, Yılmaz S (2016) Evaluation of citrus limon peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. Aquaculture 465: 13-18.

- Baser KHC, Kurkcuoglu M, Tarimicilar G, Kaynak G (1999) Essential oils of *Mentha* species from northern Turkey. J Essent Oil Res 11: 579-588.
- Baser KHC, Kurkcuoglu M, Demirci B, Ozek T, Tarimcilar G (2012) Essential oils of *Mentha* species from Marmara region of Turkey. J Essent Oil Res 24: 265-272.
- Brada M, Bezzina M, Marlier M, Lognay GC (2007) Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de Algérie. Biotechnol Agron Soc Environ 11: 3-7.
- Beghidja N, Bouslimani N, Benayache F, Benayache S, Chalchat J (2007) Composition of the oils from *Mentha pulegium* grown in different areas of the East of Algeria. Chem Nat Compd 43: 481-483.
- Boukhebti H, Chaker AN, Belhadj H, Sahli F, Ramdhani M, Laouer H, Harzallah D (2011) Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. Der Pharmacia Lett 3: 267-275.
- Campagnolo R, Freccia A, Bergmann RR, Meurer F, Bombardelli RA (2013) Óleos essenciais na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo. Rev Bras Saúde Prod Anim 14 (3): 565-573.
- Chang PH, Plumb JA (1996) Effects of salinity on *Streptococcus* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of Applied Aquaculture 6: 39-45.
- Dairiki JK, Majolo C, Chagas EC, Chaves FCM, Oliveira MR, Morais IS (2013) Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. Circ Tec Embrapa Manaus 42: 1-8.
- David EFS, Mischan MM, Boaro CSF (2007) Desenvolvimento e rendimento de óleo essencial de menta (*Mentha x piperita* L.) cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. Rev Biotemas 20 (2): 15-26.
- Dugenci S K, Arda N, Candan A (2003) Some medicinal plants as immunostimulant for fish. J Ethnopharmacol 88: 99-106.
- Dwivedi S, Khan M, Srivastava SK, Syamasunnde KV, Srivastava A (2004) Essential oil composition of different accessions of *Mentha piperita* L. grown on the northern plains of India. J Flavour Frag 19: 437-440.

- Evans JJ, Klesius PH, Pasnik DJ, Bohnsack JF (2009) Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerg Infect Dis* 15(5): 774-776.
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA (2006). Streptococcus in warm-water. *Aquaculture Health International* 7: 10-13.
- Evans JJ, Klesius PH, Gilbert PM, Shoemaker CA, Sarawi MAA, Landsberg J, Duremdez R, Marzouk AA, Zenki SA (2002) Characterization of β-hemolytic group B Streptococcus agalactiae in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri*, in Kuwait. *J Fish Dis* 25: 505-513.
- Facimoto CT, Chideroli RT, Gonçalves DD, Carmo AO, Kalaphotakis E, Pereira UP (2017) Whole-Genome Sequence of *Streptococcus agalactiae* Strain S13, Isolated from a fish eye from a Nile Tilapia Farm in Southern Brazil. *Genome Announcements* 5(35): e00917-17.
- Fu C, Cui Y, Hung SSO, Zhu Z (1998) Growth and feed utilization by F<sub>4</sub> human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *J Fish Biol* 53: 115-129.
- Furahata K, Dogasaki C, Hara M, Fukuyama M (2003) Antimicrobial activities of several herbs on *Legionella pneumophila*. *J Azabou Univ* 1/2: 15-20.
- Harrewijn P, Van Oosten AM, Piron PEM (2001) Function of natural terpenoids in the relationships between organisms. In: Natural Terpenoids as messengers: a multidisciplinary study of their production, biological function and practical application 5: 181-252.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS (2011) Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317 (1-4): 1-15.
- Hassan BAR (2013) Medicinal plants (importance and uses). *Pharm Anal Acta* 3: e139. doi: 10.4172/2153-2435.1000e139.
- Hrubec TC, Smith SA (2010) Hematology of Fishes. In: Weiss DJ, Wardrop J, Schalm OW (Eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*. Iowa: Blackwell Publishing, pp. 994-1003.
- Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani AH (2010) Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J Sci Food Agric* 90: 1827-1836.

- Iscan G, Kirimer N, Kurkcuoglu M, Baser KHC, Demirci F (2002) Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. J Agric Food Chem 50: 3943-3946.
- Ishikawa NM, Ranzani-Paiva MJT, Lombardi JV (2008) Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. Arch Vet Sci 13: 54-63.
- Karaman I, Sahin F, Gulluce M, Ogutçu H, Jengul M, Adiguzel A (2003) Antimicrobial activity of aqueous and metanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L J Ethnopharmacol 85: 231-235.
- Kanani HG, Nobahar Z, Kakoolaki S, Jafarian H (2014) Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. Fish Physiol Biochem 40: 481-490.
- Kasrati A, Alaoui Jamali C, Bekkouche K, Spooner-Hart R, Leach D, Abbad A (2015) Chemical characterization and insecticidal properties of essential oils from different wild populations of *Mentha suaveolens* subsp. *timija* (Briq.) Harley from Morocco. Chem. Biodiv 12: 823-831.
- Kayansamruaj P, Pirarat N, Katajiri T, Hirono I, Rodkhum C (2014) Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 26: 488-495.
- Kokkini S, Handilou E, Karousou R, Lanaras T (2002) Variations of pulegone content in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants growing wild in Greece. J. Essent. Oil Res 14: 224-227.
- Kubitza F (2011) Tilápis: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí. 2<sup>a</sup> ed. 316 p.
- Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S (2011) Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. Ind Crop Prod 34 (1): 802-817.
- Lawrence BM (2006) Mint: The Genus *Mentha*, CRC, Boca Raton, FL.
- Lim C, Klesius PH, Li MH, Robinson EH (2000) Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture 185: 313-327.
- Loewenfeld C, Back F (1980) Guia de hierbas y especias. Omega 213-215.

- Lorenzi H, Matos FJA (2002) Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, Plantarum.
- Magnadóttir B (2006) Innate immunity of fish (overview). Fish & Shellfish Immunol 20: 137-151.
- Mahady GB, Pendland SL, Stoia A, Hamill FA, Fabricant D, Dietz BM, Chadwick LR (2005) In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. Phytother Res 19: 988-991.
- Majolo C, Chagas EC, Chaves FCM, Bizzo HR, Rocha SIB, Oliveira SRN, Oliveira MAS (2016) Composição uímica e atividade antibacteriana de óleos essências. Embrapa Documentos nº 126.
- Marzouk, B, Fredj MBH, Chraief I, Mastouri M, Boukef K, Marzouk Z (2008) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. J Food Agric Environ 6: 78-82.
- Melo DC, Oliveira DAA, Melo MM, Junior DV, Teixeira EA, Guimarães SR (2009) Proteic electrophoretic profile of chitalada tilapia nilotic (*Oreochromis niloticus*), exposed to hypoxia chronic stress. Arq Bras Med Vet Zootec 61(5): 1183-1190.
- MSD Animal Health (2012) MSD Animal HealthTechnical Bulletin: *Streptococcus* in the Tilapia Environment. [http://aqua.merck-animal-health.com/binaries/AquaVac\\_StreSa\\_tech01\\_0Nov12\\_050STREP\\_cm56-35564.pdf](http://aqua.merck-animal-health.com/binaries/AquaVac_StreSa_tech01_0Nov12_050STREP_cm56-35564.pdf).
- McKay DL, Blumberg JB (2006) A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). Phytother Res 20(8): 619-633.
- McLafferty FW, Stauffer DB (1994) Registry of Mass Spectral Data, 6<sup>th</sup> Electronic Edition; Wiley: New York.
- Navarrete P, Toledo I, Mardones P, Opazo R, Espejo R, Romero J (2010) Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. Aquac Res 41(10): 667-678.
- Nya EJ, Austin B (2009) Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J Fish Dis 32: 971-977.
- Oba ET, Mariano WS, Santos LRB (2009) Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para manejo. In: TAVARES-

- DIAS M (Org.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa: 226-247.
- Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, Kole CR (1997) Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 89(358):39-46.
- Pessoa ODL, Carvalho CBM, Silvestre JOVL, Lima MCL, Motta Neto R, Matos FJA, Lemos TLG (2005) Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia* aff. *Gracillis*. *Fitoterapia* 70:712-714.
- Pinto DML (2010) Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e extrato de *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo.
- Pluddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S (2006) The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. *Expert. Ver. Mol. Med.* 8: 1-25.
- Rasooli I, Shayegh S, Taghizadeh M, Astaneh SDA (2008) Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. *Phytother Res* 22:1162-1167.
- Ranzani-Paiva MJT, Pádua SB, Tavares-Dias M, Egami, MI (2013) Métodos para análise hematológica em peixes. Eduem, Maringá, 140.
- Ranzani-Paiva MTJ, Silva-Souza AT (2004) Hematologia de Peixes Brasileiros. In: Sanidade de Organismos Aquáticos / organizadores Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Ricardo Massato Takemoto, Maria de Los Angeles Perez Lizama. São Paulo: Editora Varela.
- Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P (2009) Protective effect of clove oil-supplemented fish diets on experimental *Lactococcus graviae* infection in tilapia. *Biosci Biotechnol Biochem* 73(9): 2085-2089.
- Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P (2010) Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Sci* 76: 287-293.
- Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal, P (2014) Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives, *Aquaculture* 433: 50-61.
- Rita P, Animesh DK (2011) An updated overview on peppermint (*Mentha piperita*). *Int Res J Pharm* 2: 1-10.

- Sarac N, Ugur A (2009) The In vitro antimicrobial activities of the essential oils of some Lamiaceae species from Turkey. *Journal of Medicinal Food* 12(4): 902-907.
- Sahu S, Das BK, Pradhan J, Mohapatra BC, Mishra BK, Sarangi N (2007) Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology* 23(1): 109-118.
- Sarrazin SLF, Oliveira RB, Barata LES, Mourão RHV (2012) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. *Food Chemistry* 134: 1474-1478.
- Sharifzadeh SA, Khara H, Ghobadi, S (2015) Effects of vitamins E and Riboflavin (B2) and combinations of them on the hematological parameters of common carp, *Cyprinus carpio* L., fingerlings, *Arch Pol Fish* 23: 107-111.
- Shayegh S, Rasooli I, Taghizadeh M, Astaneh SDA (2008) Phytotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque. *Nat Prod Res* 22 (5): 428-439.
- Silva BC, Martins ML, Jatobá A, Buglione-Neto CC, Vieira FN, Pereira GV, Jerônimo GT, Seiffert WQ, Mourão JLP (2009) Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesq Vet Bras* 29: 874-880.
- Sivropoulou A, Kokkini S, Laranas T, Aresnakis M (2002) Antimicrobial activity of mint essential oil. *J Agric Food Chem* 43: 2484-2488.
- Sitzmann J, Habegger R, Schnitzler WH, Grassmann J (2014) Comparative analysis of antioxidant activities of fourteen *Mentha* essential oils and their components. *Chem Biodivers* 11: 1978-1989.
- Sokovic MD, Vukojevic J, Marin PD, Brkic DD, Vajs V, Griensven LJLD (2009) Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules* 14: 238-249.
- Swain P, Sahoo PK, Ayyapan S (2006) *Fish and Shellfish Immunology: An introduction*. Narendra Publishing House, Delhi.
- Talpur AD, Ikhwanuddin M, Bolong AMA (2013) Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 400: 46-52.

- Tavares-Dias M, Faustino CD (1998) Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. Revista Ars Veterinária 14: 254-263.
- Tavares-Dias M, Ishikawa MM, Martins ML, Satake F, Hisano H, Pádua SB, Jerônimo GT, Sant'ana AR (2009) Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. 43-80. In: Saran-Neto, Mariano & Pozzobon-Soria (Eds), Tópicos Especiais em Saú- de e Criação Animal. Pedro and João Editores, São Carlos.
- Teixeira B, Marques A, Ramos C, Batista I, Serrano C, Matos O, Neng NR, Nogueira JMF, Saraiva JA, Nunes ML (2012) European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. Ind Crop Prod 36: 81-87.
- Ushimaru PK, Silva MTN, Di SC, Barbosa L, Fernandes Junior A (2007) Antibacterial activity of medicinal plant extracts. Braz J Microbiol 38 (4): 717-719.
- Vallejos-Vidal E, Reyes-Lopez F, Teles M, MacKenzie S (2016) The response of fish to immunostimulant diets, Fish. Shellfish Immunol 56: 34-69.
- Valladão GMR, Gallani SU, Pala G, Jesus RB, Kotzent S, Costa JC, Silva TFA, Pilarski F (2017) Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. Aquac Res 48:5640-5646.
- Valeriano C, Piccoli RH, Cardoso MG, Alves E (2012) Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. Rev Bras Plantas Med 14(1): 57-67.
- Valmorbida J, Boaro CSF, Marques, MOM, Ferri AF (2006) Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha x piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. Rev Bras Plantas Med 8(4): 56-61.
- Van Hai N (2015) The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. Aquaculture 446: 88-96.
- Villeda DAC (2013) Effect of dietary essential oils supplementation on growth performance, protein digestibility and digestive enzymes in juvenile gilthead seabream fed a low fishmeal diet. Dissertação. Universidade do Algarve, Faro.

- Weichselbaum CTE (1946) An accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. Am. J Clin Pathol 16(3): 40-49.
- WU S (1970) New bacterial disease of tilapia. Fish Culture Bulletin 23: 3-40.
- Zheng ZL, Tan JYW, Liu HY, Zhou XH, Xiang X, Wang K.Y (2009) Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against aeromonas hydrophila in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture 292(3-4): 214-218.
- Zwaving JH, Smith D (1971) Composition of the essential oil of Austrian *Mentha pulegium*. Phytochemistry 10: 1951-1953.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do óleo essencial de hortelã (*Mentha piperita*) revelou-se uma alternativa eficiente para promover a resistência a enfermidades em juvenis de tilápia-do-nilo. Em relação às concentrações testadas, a inclusão de 0,25% de *M. piperita* na dieta proporcionou os melhores resultados. Futuros estudos são indispensáveis para testar os efeitos de doses maiores e/ou intermediárias deste óleo, a fim de determinar a concentração ideal que proporcione efeitos benéficos à espécie. Finalmente, de posse de ampla informação sobre o mecanismo de ação do óleo essencial de hortelã, serão possíveis estudos que avaliem a aplicação dele combinado a outros óleos essenciais para verificar possíveis efeitos sinérgicos de seus compostos.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABUTBUL, S.; GOLAN-GOLDHIRSH, A.; BARAZANI, O; ZILBERG, D. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). **Aquaculture**, v. 238, p. 97-105, 2004.
- ADEL, M.; POURGHOLAM, R.; ZORRIEHZAHRA, J.; GHIAZI, M. Hemato-Immunological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 55, p. 267- 273, 2016.
- ADEL, M.; AMIRI, A.A.; ZORRIEHZAHRA, J.; NEMATOLAH, A.; ESTEBAN, M.A. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 841-847, 2015.
- AKDOGAN, M.; GULTEKIN, F.; YONTEM, M. Effect of *Mentha piperita* (Labiatae) and *Mentha spicata* (Labiatae) on iron absorption in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 20, n. 6-10, p.119-22, 2004.
- AMAL, M.; ZAMRI-SAAD, M. Streptococciosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, n. 2, p. 195-206, 2011.
- ANDRADE, T.J.V.; SOUSA, F.A.; MORAIS; C.R. Avaliação do florfenicol como tratamento preventivo de doenças bacterianas no cultivo de tilápias em sistema superintensivo. **Getec**, v. 6, n. 13, p. 13-25, 2017.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamentos Fitoterápicos**. 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 22 junho 2014.
- ARAÚJO, C.S.O.; TAVARES-DIAS, M.; GOMES, A.L.S.; ANDRADE, S.M.S.; LEMOS, J.R.G.; OLIVEIRA, A.T.; CRUZ, V.R.; AFFONSO, E.G. *Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em Arapaima gigas Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil*. In: Tavares-Dias, M. (Org.). Manejo e Sanidade de peixes em Cultivo. 1 ed. Macapá, AP: Embrapa Amapá, v. 1, p. 389-424. 2009.

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

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; SOUZA, C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, v. 237, p. 229-236, 2004.

BASMACIOĞLU MALAYOĞLU, H.; BAYSAL, S.; MISIRLIOĞLU, Z.; POLAT, M.; YILMAZ, H.; TURAN, N. Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets. **British Poultry Science**, v. 51, n. 1, p. 67-80, 2010.

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

BAULNY, M.O; QUENTEL, C.; FOURNIER, V.; LAMOUR, F.; LEGOUVELLO, R. Effect of long-term oral administration of beta-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. **Diseases of Aquatic Organism**, v. 26, p. 139-147, 1996.

BHATTACHARJEE, S. *Mentha spicata*. Pointer Publications, Jaipur, India, 1998.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p.126, 2011.

BONATO, M. A.; SAKOMURA, N. K.; PIVA, G. H.; BARBOSA, N. A. A.; MENDONÇA, M. O.; FERNANDES, J. B. K. Efeito de acidificantes e extratos vegetais sobre o desempenho e qualidade de ovos de poedeiras comerciais. **ARS Veterinária**, v. 24, n.3, p. 186-192, 2008.

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

BULLOCK, G.; BLAZER, V.; TSUKUDA, S.; SUMMERFELT, S. Toxicity of acidified chitosan for cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 182, p. 273-280, 2000.

BUNCH, E.C.; BEJERANO, I. The effect of environmental factors on the susceptibility of hibrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* to streptococcosis. **Israeli Journal of Aquaculture**, v. 49, n. 2, p. 67-76, 1997.

BHUJEL, R. C. A **Manual for tilapia business management**. CABI, 2014. ISBN 9781780641362. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=p8aWBAAAQBAJ> > Acesso: 12 novembro 2017.

BLUMENTHAL, M; BUSSE, WR. **The complete german commission e monographs**: therapeutic guide to herbal medicines. Boston: American botanical Council, 1998.

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

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

CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

CALLANDER, JT; JAMES, PJ. Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 271-278, 2012.

CARSON CF, HAMMER KA, RILEY TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 50-62, 2006.

CONROY, G. Prevalence of *Streptococcus* in Latin America. **The Fish Site** 2009.

COSTA, J. C.; VALLADÃO, G. M. R.; PALA, G.; GALLANI, S. U.; KOTZENT, S.; CROTTI, A. E. M.; PILARSKI, F. Copaifera duckei oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 471, p. 72-79, 2017.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

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

CUNHA, M.A; SILVA, B.F.; DeLUNARDO, F.A.C.; BENOVITI, S.C.; GOMES, L.C.; HEINZMANN, B.N; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lipia alba*. **Newtropical Ichthyology**, v. 9, p. 638-688, 2011.

DESCHAMPS, C; MONTEIRO, R; MACHADO, M.P; SCHEER, A.P, COCCO, L; YAMAMOTO, C. Avaliação de genótipos de *Mentha arvensis*, *Mentha x piperita* e *Mentha* spp. para produção de mentol. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 178-183, 2013.

DONG, H.T.; NGUYEN, V.V.; LE, H.D.; SANGSURIYA, P.; JITRAKORN, S.; SAKSMERPROME, V.; SENAPIN, S.; RODKHUM, C. Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. **Aquaculture**, v. 448, n. 1, p. 427-435, 2015.

- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2008.
- EL-SAYED, A-F. M. Tilápis Culture. **CAB Publishing**. v. 1, p. 17-40, 2006.
- FARIA, F. C.; LEAL, C. A. G.; CARVALHOCASTRO, G. A.; LEITE, R.C; FIGUEIREDO H.C. Carrier state induced by oxytetracycline therapy against streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases** (in print), v. 37, n.9, p. 853-7, 2013.
- FARROQI, A.H.A.; SANGWAN, R.S. Effect of different photoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in *Mentha* species. **Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 181-187, 1999.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; GODOY, T. D.; LEAL, C.A.G. Antibióticos na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, v.18, n.105, p. 42-49, 2008.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; MIAN, G.F.; GODOY, D.T. Estreptococose em tilápis do Nilo - parte 1. **Panorama da Aquicultura**, v. 103, p. 36- 38, 2007.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; CARNEIRO, D.O.; FARIA, F.C.; COSTA, G.M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápis-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte**, v. 58, n. 4, p. 678-680, 2006.
- FOSTER, S. **Peppermint, *Mentha x piperita***. In Botanical Series; American Botanical Council: Austin, 1990.
- GARCIA, V.; GREGORI, P. C.; HERNANDEZ, F.; MEGIAS, M. D.; MADRID, J. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, n. 4, p. 555-562, 2007.

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. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 956-962, 2007.

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

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

HARIKRISHNAN R.; BALASUNDARAM, C. In vitro and in vivo studies of the use of some medicinal herbals against fish pathogen *Aeromonas hydrophila* in goldfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 20, p. 165-176, 2008.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Effect of chemotherapy, vaccines and immunostimulants on innate immunity of goldfish infected with *Aeromonas hydrophila*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.88, p. 45-54, 2009.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; KIM, M.C.; KIM, J.S.; HAN, Y.T.; HEO, M.S. Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, p. 508-515, 2009.

HARDARI, A; NOBAKHT, A; SAFAMEHR, A. Investigation the effects using Nettle (*Urtica dioica*), Menta pulagum (*Oreganum valgare*) 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.

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.

HARRIS, B. Menthol: a review of its thermoreceptor interactions and their therapeutic applications. **International Journal of Aromatherapy**, v.16, p.117-131, 2006.

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

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 27, p. 273-292, 2005.

ISCAN, G; DEMIRCI, F; KIRIMER, N; KURKCUOGLU, M; BASER, K.H.C. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 3943-3946, 2002.

JANG, I.S.; KO, Y.H.; KANG, S.Y.; LEE, C.Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, n. 3, p. 304-315, 2007.

JIMÉNEZ, A.; REY, A.L.; PENAGOS, G.; ARIZA, M.F.; FIGUEROA, J.; IREGUI, C.A. *Streptococcus agalactiae*: Hasta ahora el único *Streptococcus* patógeno de tilapias cultivadas en Colombia. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 285-294, 2007.

KAWAKAMI, H.; SHINOHARA, N.; SAKAI, M. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. **Fish Pathology**, v. 33, p. 287-292, 1998.

KEIFER, M.D.D.; ULBRICHT, C., RAE ABRAMS, P.T.; ETHAN BASCH, P.D.; GIESE, M.D.N.; GILES, M.S.M. Peppermint (*Mentha piperita*): An evidence-based systematic review by the Natural Standard Research Collaboration. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v. 7, p. 91-143, 2007.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDS, P.; BOULAMATSIS, A. Antimicrobial activity of some plants extracts and essential oils against

foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Food Science and Technology**, v. 41, p.119-127, 2007.

KUBITZA, F. Tilápia na mira dos patógenos. **Panorama da Aquicultura**, v. 18, n. 107, p. 28-37, 2008.

KULKARNI, R.R.; PAWAR, P.V.; JOSEPH, M.P.; AKULWAD, A.K.; SEM, A.; JOSHI, S.P. *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles sfttcephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Pest Science**, v. 86 (4), 713-718, 2013.

LIMA, B.T.M. **Adição do óleo de *Citrus sinensis* na dieta de tilápia-do-Nilo: desempenho produtivo, perfil hematológico e atividade respiratória de leucócitos.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura. Jaboticabal, 2015.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G. Família Lamiaceae: Importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitoterá**, v. 3, n. 3, 2007.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIA, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 137-151, 2006.

MALHEIROS, D. F.; MACIEL, P. O.; VIDEIRA, M. N.; TAVARES-DIAS, M. Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). **Aquaculture**, v. 455, 81-86, 2006.

MARCUSSO, P. F. M.; ETO, S. F., CLAUDIANO, G.S., VIEIRA , F.C. F.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAE, F. R. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 549-554, 2015.

MARCUSSO, P. F.; SALVADOR, R.; MARINHO-NETO, F. A. Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 16, n. 2, p. 165-169, 2017.

MAQSOOD, S.; SINGH, P.; SAMOON, M.H.; MUNIR, K. Emerging role of immunostimulants in combating the disease outbreak in aquaculture. **International Aquatic Research**, v.3, p.147-163, 2011.

MARTINS, M.L. Cuidados básicos e alternativos no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. In: RANZANI- PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, p. 355-368, 2004.

MARTINS, M.L.; AZEVEDO, T.M.P.; GHIRALDELLI, L.; BERNARDI, N. Can the parasitic fauna on Nile tilapias be affected by different production systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.2, p.493-500, 2010.

MASIH, K. N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 181-191, 2000.

MATOS, B.M.; KOMIYAMA, E.Y.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C.Y. Antifungal activity of *Mentha piperita* alcoholic extract on *Candida albicans* and *C. tropicalis*. **Revista de Odontologia UNESP**, v. 38, n. 4, p. 244-248, 2009.

MCKAY DL, BLUMBERG JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). **Phytotherapy Research**, v. 20: p. 619–633,2006.

MEHANA, E.E.; RAHMANI, A.H.; ALY, S.M. Immunostimulants and fish culture: an overview. **Annual Research & Review in Biology**, v. 5, p. 477-489, 2015.

MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; MIHAJLOVIC, B; MATAVULJ, M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *mentha* species essential oils. **Planta Medica**, v. 69, n. 5, p. 413-419, 2003

MORAIS, L.A.S. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira** 27: S4050- S4063.

MULERO, V.; ESTEBAN, M.A; MUÑOZ, J. MESEGUR, J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, p. 49-62, 1998.

MUNIRUZZAMAN M, CHOWDHURY MBR. Evaluation of medicinal plants through fish feed against bacterial fish disease. **Progressive Agriculture**, v. 19, n. 2, p. 151-159, 2008.

MURTHY, K.S; KIRAN, B.R. Review on usage of medicinal plants in fish diseases. **International Journal of Pharma and BioSciences**, v. 4, n. 3 B, p. 975-986, 2013.

NOBAKHT, A.; MEHMANNAVAZ, Y. Investigation the effects of using different levels of *Thymus vulgaris*, Lamiaceae *Mentha piperita* and *Oreganum vulgare* and their different mixtures on yield, egg quality, blood and immunity parameters of laying hens. **Journal of Animal Science**, v. 41, p. 129-136, 2010.

NOGA, E. J. **Fish Disease**: Diagnosis and Treatment. 2a. ed. Iowa Staty University: Library of Congress Catalogin, p. 519, 2010.

NGUYEN HT; KANAI, K.; YOSHIKOSHI, K. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. **Aquaculture**, v. 205, p. 7-17, 2002.

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

OUATTARA, B., SIMARD, R.E., HOLLEY, R.A.; PIETTE, G.J; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 155-162, 1997.

OETTING, L.L. **Extratos vegetais como promotores do crescimento crescentes de leitões recém-desmamados**. Tese de doutorado em Agronomia. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

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

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

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

PINTO, Delia Manuela Luna. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e extrato de Minthostachys setosa (Briq.) Epling**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2010.

PINTO, J.A.P.; KANEKO, T.M; OHARA, M.T. Dosagem microbiológica de antibióticos e fatores de crescimento. In: **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, p. 261-290, 2003.

PLUMB, J. A. Overview of Warmwater Fish Diseases. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, n. 2, p. 1-10, 1999.

PRIDGEON JW, Klesius PH. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* as potential vaccines by selecting for resistance to sparfloxacin. **Vaccine**, v. 31, n. 24, p. 2705-2712, 2013.

RANZANI-PAIVA, M.T.J., SILVA-SOUZA, A.T. **Hematologia de Peixes Brasileiros**. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO R.T.; LIZAMA, M.A.P. (org.) Sanidade de Organismos Aquáticos, São Paulo, 2004. Editora Varela.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Use of Asiatic pennywort *Centella asiatica* aqueous extract as a bath treatment to control columnaris in Nile tilapia. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 22, 14-20, 2010.

REZENDE, R. A. E. **Enrofloxacina na piscicultura: estudo da incorporação do fármaco na ração visando a redução da taxa de**

**lixiviação na água.** 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

RIBEIRO, S.C; CASTELO, A.S.; SILVA, B.M.P.; CUNHA, A.S.; PROIETTI JÚNIOR, A.A.; OBA-YOSHIOKA, E.T. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Acta Amazônica**, v. 46, n.1, p. 99-106, 2016.

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

ROMERO, E. TATEO, F. DEBIAGGI, M. Antiviral activity of *Rosmarinus officinalis* L. extract. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 80, p. 113-119, 1989.

SALINAS, I.; LOCKHART, K.; BOWDEN, T.J.; COLLET, B.; SECOMBES, C.; ELLIS, A.E. Assessment of immunostimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and the effect of temperature on the kinetics of Mx responses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 17, p. 159-170, 2004.

SAHU, S.; DAS, B. K.; PRADHAN, J.; MOHAPATRA, B. C.; MISHRA, B. K.; SARANGI, N. Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n.1, p. 109-118, 2007.

SALVADOR, R.; MÜLLER, E. E.; LEONHARDT, J. H. PRETTO-GIORDANO, L.; DIAS, J. A.; FREITAS, J. C.; MORENO, A. M. Isolamento de *Streptococcus* spp. de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2003.

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

SAMAD APA, SANTOSO U, LEE MC, NAN FH. Effects of dietary katuk (*Sauvagesia androgynus* L. Merr.) on growth, non-specific immune and diseases resistance against *Vibrio alginolyticus* infection in grouper *Epinephelus coioides*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, p. 582-589, 2014.

SANTOS, V.M.C.S, PINTO, M.A.S, BIZZO, H, DESCHAMPS, C. Seasonal variation of vegetative growth, essential oil yield and composition of menthol mint genotypes at southern **Brazilian Bioscience Journal**, v. 28, n. 5, p. 790-798, 2012.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POSSATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de oregano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37 n. 3, p. 803-808, 2007.

SCHRECK, C. B. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. (eds.), **The biology of animal stress**. Oxon, England: CABI Publishing, 2000, p. 147-158.

SILVA, N.C.C.; FERNANDES-JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SILVA, B.C.; MARTINS, M.L.; JATOBÁ, A.; NETO, C.C.B.; VIEIRA, F.N.; PEREIRA, G.V.; JERÔNIMO, G.T.; SEIFFERT, W.Q.; MOURIÑO, J.L.P. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 874-880, 2009.

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

SIQUI, A.C; SAMPAIO, A.L.F, SOUSA, M.C, HENRIQUES, M.G.M.O; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais - potencial antinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2010.

SOARES, B. V.; NEVES, L.R.; OLIVEIRA, M.S.B; CHAVES, F. C. M.; DIAS, M. K. R.; CHAGAS, E. C.; TAVARES – DIAS, M. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma*

*macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. **Aquaculture**, v. 452, p. 107-114, 2016.

SUTILI, F. J.; CUNHA, M. A.; ZIECH, R. E.; KREWER, C. C.; ZEPPENFELD, C. C.; HELDWEIN, C. G.; GRESSLER, L.T.; HEINZMANN, B. M.; VARGAS, A. C.; BALDISSEROTTO, B. *Lippia alba* essential oil promotes survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) infected with *Aeromonas* sp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 95-100, 2015.

STITES, D. P, TERR, A. I. Basic and Clinical Immunology, **Appleton & Lange**, v. 7, p. 870, 1995.

TALPUR, A.D. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture**, v. 420-421, p. 71–78, 2014.

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

TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: EMBRAPA, 2009.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. 1<sup>a</sup>ed. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, p. 131, 2004.

THOMSEN PS, JENSEN TM, HAMMER KA, CARSON CF, MØLGAARD P, RILEY TV. Survey of the antimicrobial activity of commercially available Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil products in vitro. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 17, n. 9, p. 835–841, 2011.

TRABULSI LR & ALTERTHUM F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, p. 760, 2008.

TROMBETTA, D. CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G; VENUTI, V.; CRISTANI, M. T.; DANIELE, C. SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three

monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6, p. 2474-8, 2005.

TUCKER, A. O; NACZI, R.F.C. *Mentha*: An overview of its classification and relationships. In: B.M. Lawrence, ed., *Mint: The Genus Mentha*. CRC Press, Boca Raton, FL. 2007, pp. 1-39.

TYLER, V.E; BRADY, L.R; ROBBERS, J.E. **Pharmacognosy**. Lea Febiger, Philadelphia, Pa, USA, 1998, pp. 27-32.

TONI, C.; BECKER, A. G.; SIMÕES, L. M.; PINHEIRO, C.G.; SILVA, L.; HEINZMANN, B. M.; CARRON, B. O.; BALDISSEROTTO, B. Fish anesthesia: effects of the essential oil of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quellen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 701-714, 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.

USHIMARU, P.I; BARBOSA, L.N; FERNANDES, A.A.H; DI STASI, L.C; JÚNIOR, A.F. In vitro antibacterial activity of medicinal plant extracts against *Escherichia coli* strains from human clinical specimens and interactions with antimicrobial drugs. **Natural Product Research**, v. 26, n. 16, p. 1553-1557, 2012.

VALLADÃO, G. M.R. **Potencial de óleos essenciais de plantas para tratamentos de enfermidades em peixes**. Dissertação (Mestrado). vi, 1 78p.: il. 29 cm, 2014.

VALLADÃO, G. M. R., GALLANI, S. U., IKEFUTI, C. V., CRUZ, C., LEVY-PEREIRA, N., RODRIGUES, M. V. N., & PILARSKI, F. Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): Special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Fish Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1143-1152, 2016.

VARDAR-ÜNLÜ, G.; CANDAN, F.; SÖKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, M.; DÖNMEZ, E.; TEPE, B. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and metanol extract of *Tymus pectinatus* Fish. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 63-67, 2003.

VASEEHARAN, B; THAYA, R. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: na alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 22, p. 1079-1091, 2014.

VOIRIN, B; BRUN, N; BAYET, C. Effects of day length on the monoterpenoid composition of leaves of *M. x piperita*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 749-755, 1990.

WHIPPLE, M.J.; GANNAM, A.L.; BARTHOLOMEW, J.L. Inability to control ceratomyxosis in rainbow trout and steelhead with oral treatments of glucan immunostimulant or the fumagillin analog TNP-470. **North American Journal of Aquaculture**, v. 64, p. 1-9, 2002.

WONGSATHEIN D. **Factors affecting experimental *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia, *Oreochromis niloticus*.** Thesis (PhD). Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland, 2012, v. 169.

YAMASHITA, M.M.; PEREIRA, S.A; CARDOSO, L.; ARAUJO, A.P.; ODA, C.E.; SCHMIDT, E.C.; BOUZON, Z.L; MARTINS, M.L. MOURIÑO, J.L.P. Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1235-1243, 2017.

YU, T.; XU, M.; DASHWOOD, R.H. Antimutagenic activity of Spearmint. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 44, p. 387-393, 2004.

ZANOLO, R. **A eficácia da vacina AquaVac® Strep Sa no controle da estreptocose em criações intensivas de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil: desempenho produtivo e lucros.** (2011). In: MSD Saúde Animal. Doenças Bacterianas em Peixes de Água Quente: Novas Estratégias para o Controle Sustentável. [http://aqua.merck-animal-health.com/binaries/WAS\\_POR\\_Pro\\_v8\\_5\\_tcm56-34217.pdf](http://aqua.merck-animal-health.com/binaries/WAS_POR_Pro_v8_5_tcm56-34217.pdf)

ZILBERG, D; TAL, A; FROYMAN, N; ABUTBUL, S; DUDAI, N; GOLAN-GOLDHIRSH, A. Dried leaves of *Rosmarinus officinalis* as a treatment for streptococcosis in tilapia. **Journal of Fish Diseases**, v. 33, n. 4, p. 361-369, 2010.

## APÊNDICE



Figura 1 - Biometria dos peixes. Fonte: desenvolvido pelo autor



Figura 2 - Tilápia-do-nilo infectada com *Streptococcus agalactiae* apresentando exoftalmia acentuada. Fonte: desenvolvido pelo autor



Figura 3 - Reisolamento da bactéria pelo postulado de Koch, a fim de confirmar o quadro de doença, mostrando os órgãos internos do peixe liquefeitos. Fonte: desenvolvido pelo autor

## **ATIVIDADES DO LABORATÓRIO AQUOS - SANIDADE DE ORGANISMOS AQUÁTICOS**

Formado por uma equipe de pesquisadores, estudantes de Pós-Graduação e Graduação, coordenado por Prof. Dr. Maurício Laterça Martins e Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mourão, o **Laboratório AQUOS**, é um laboratório de pesquisa na área de Patologia de Organismos Aquáticos, sediado no Centro de Ciências agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Tem como objetivo desenvolver pesquisa básica e aplicada, para atender às diferentes necessidades do setor produtivo da aquicultura relacionadas às enfermidades. Cumpre este objetivo com o desenvolvimento de projetos de pesquisa, dissertações de Mestrado e teses de Doutorado. Logo, contribui com a formação de recursos humanos, como profissionais graduados, mestres, doutores e pós doutores altamente qualificados preparados para a demanda.

O laboratório possui as seguintes linhas de pesquisa: Ictiopatologia, Ictioparasitologia, Hematologia, Ecologia de parasitos de peixes, Estresse e inflamação em peixes, Probióticos na aquicultura, Imunoprofilaxia, Tratamento de patógenos com fitoterápicos, Doenças parasitárias e hemato-imunologia de cefalópodes.

Os conhecimentos obtidos nestas pesquisas, são publicados em artigos científicos de âmbito nacional e internacional, livros e capítulos de livro, contribuindo para práticas adequadas de manutenção da saúde de organismos aquáticos, bem como relatos da presença de patógenos em animais aquáticos selvagens ou cultivados, e recomendações de medidas de controle. Possui parceria com instituições públicas como EMBRAPA, EPAGRI, Universidades Federais, Estaduais, Particulares e companhia privada AQUIVET Saúde Aquática, na forma de trabalhos em rede, sempre visando melhor produtividade da atividade.