

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**Óleos essenciais de plantas na dieta de tilápia-do-Nilo: efeitos sobre a saúde,  
morfologia intestinal e microbiota**

**Gustavo Moraes Ramos Valladão**

**Médico Veterinário**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO**

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**Óleos essenciais de plantas na dieta de tilápia-do-Nilo: efeitos sobre a saúde,  
morfologia intestinal e microbiota**

**Gustavo Moraes Ramos Valladão**

**Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski**

**Tese apresentada ao programa de pós-  
graduação do Centro de Aquicultura da  
Unesp, como parte das exigências para  
a obtenção do título de Doutor em  
Aquicultura**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO**

**2018**

V136o Valladão, Gustavo Moraes Ramos  
Óleos essenciais de plantas na dieta de tilápia-do-Nilo: efeitos sobre a saúde, morfologia intestinal e microbiota / Gustavo Moraes Ramos Valladão. -- Jaboticabal, 2018  
x, 115 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2018

Orientadora: Fabiana Pilarski

Banca examinadora: Fabiana Pilarski, Luiz Eduardo Corrêa Fonseca, Raquel Regina Duarte Moreira, Fabiana Garcia Scaloppi, Eduardo Makoto Onaka

Bibliografia

1. aquicultura. 2. fitoterápicos. 3. hematologia. 4. imunologia. 5. melaleuca. 6. menta. 7. *Oreochromis niloticus*. 8. tomilho. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 636.084:636.31

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Óleos essenciais de plantas na dieta de tilápia-do-Nilo:  
efeitos sobre a saúde, morfologia intestinal e microbiota

**AUTOR:** GUSTAVO MORAES RAMOS VALLADÃO

**ORIENTADORA:** FABIANA PILARSKI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AQUICULTURA,  
pela Comissão Examinadora:

*Fabiana Pilarski*

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI  
./ Centro de Aquicultura - CAUNESP

*Luiz Eduardo Corrêa Fonseca*

Prof. Dr. LUIZ EDUARDO CORRÊA FONSECA  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de  
Araçatuba/Unesp

*Raquel Regina Duarte Moreira*

Profa. Dra. RAQUEL REGINA DUARTE MOREIRA  
Depto de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP- Araraquara

*Fabiana Garcia*

Profa. Dra. FABIANA GARCIA SCALOPPI  
Departamento de Descentralização do Desenvolvimento / APTA / Votuporanga-SP

*Eduardo Makoto Onaka*

Pesquisador Dr. EDUARDO MAKOTO ONAKA  
Aquicultura / APTA / São José do Rio Preto/SP

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2018.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
Capítulo 1 .....	11
1. Introdução.....	11
2. Revisão bibliográfica.....	12
2.1. Uso de aditivos alimentares na aquicultura.....	12
2.2. Óleos essenciais (OEs) de plantas .....	13
2.2.1. <i>Melaleuca alternifolia</i> (árvore de chá) .....	15
2.2.2. <i>Mentha piperita</i> (Hortelã pimenta) .....	16
2.2.3. <i>Thymus vulgaris</i> (tomilho).....	16
2.3. Aspectos gerais da saúde dos peixes .....	17
2.3.1. Hematologia.....	18
2.3.2. Bioquímica.....	20
2.3.3. Imunologia .....	22
2.4. Saúde intestinal .....	25
2.4.1. Morfologia intestinal.....	25
2.4.2. Microbiota intestinal .....	27
2.5. Status da produção atual: tilapicultura .....	29
3. Objetivo geral .....	29
4. Referências .....	30
Capítulo 2 - Manuscrito publicado no periódico “Aquaculture research” .....	42
Abstract.....	43
Introduction.....	44
Material and Methods .....	46
Fish and study design .....	46
Herbal medicines and diet .....	47
Blood parameters.....	48
Hematological parameters .....	48
Biochemical parameters .....	49
Immunological parameters .....	49
Intestinal morphology .....	50
Statistical analysis .....	51
Results.....	51

Essential oils.....	51
Hematological parameters.....	51
Biochemical parameters .....	57
Immunological parameters .....	57
Intestinal morphology .....	60
Discussion .....	63
Acknowledgements.....	65
References.....	65
Capítulo 3 - Resultados apresentados em congresso na forma de pôster. ....	71
Capítulo 4 – Manuscrito nas normas do periódico “Aquaculture Research” .....	84
Abstract.....	85
Introduction.....	86
Material and Methods .....	88
Study 1.....	88
Fish and experimental conditions .....	88
<i>Thymus vulgaris</i> essential oil (TVEO) and diet .....	88
Blood parameters .....	91
Intestinal morphology.....	93
Study 2.....	94
Fish and study design .....	94
<i>Thymus vulgaris</i> essential oil (TVEO) and diet .....	94
Quantification of intestinal bacteria .....	94
Statistical analysis .....	97
Results.....	97
Study 1.....	97
Blood parameters .....	97
Intestinal morphology.....	100
Study 2.....	100
Quantification of intestinal bacteria .....	100
Discussion.....	102
Acknowledgments .....	104
References.....	105
Capítulo 5 - Considerações finais.....	111
Capítulo 6 - Anexos.....	115

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio e estrutura dados a mim para que eu pudesse seguir meus estudos e meus sonhos, e ao meu amor Sílvia Umeda Gallani e sua família pelo companheirismo e carinho.

Sou eternamente grato à minha orientadora Dra. Fabiana Pilarski pela oportunidade de ter trabalhado em seu laboratório, pela confiança que depositou em mim desde o início da minha carreira na aquicultura, pelos ensinamentos e pela amizade construída.

Agradeço imensamente aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos pelo auxílio nas análises da presente tese (e de diversos outros trabalhos), pelos ensinamentos diários e pela amizade ao longo de todos esses anos.

Sou grato ao CAUNESP e a todo seu quadro de funcionários e pesquisadores, os quais forneceram estrutura, conhecimento e dedicação para que as pesquisas pudessem ser realizadas.

Agradecimentos à Dra. Vany P. Ferraz (Departamento de Química – UFMG) pelo auxílio com as análises dos óleos essenciais.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (140487/2014-0) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2014/14039-9) por terem financiado este projeto permitindo sua execução.

## RESUMO

Os óleos essenciais (OEs) de plantas são compostos estudados como aditivo alimentar na produção animal há alguns anos, sendo descritos por diversos autores como promotores de crescimento, imunoestimulantes e antimicrobianos. No entanto, os efeitos de sua adição na dieta de organismos aquáticos ainda são pouco conhecidos. No presente estudo, diferentes estratégias de suplementação com diferentes OEs foram testadas. No primeiro estudo, os OEs de *Mentha piperita* e *Melaleuca alternifolia* foram incorporados à dieta para tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* por um longo período (2 meses), e os seus efeitos sobre a saúde (parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos) e sobre o intestino (morfologia e morfometria) foram avaliados. Em um segundo momento, *M. piperita*, *M. alternifolia*, *Citrus aurantium*, *Cymbopogon nardus*, *Ocimum basilicum* e *Thymus vulgaris* foram testados *in vitro* contra isolados intestinais (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* e *Edwardsiella tarda*) da tilápia-do-Nilo para seleção daquele com maior capacidade de modular a microbiota dos peixes. O OE de *Thymus vulgaris* foi aquele que apresentou a maior atividade contra as bactérias testadas. Em um estudo final, o OE de *Thymus vulgaris* foi incorporado à dieta e fornecido por 15 dias à tilápia-do-Nilo e o efeito sobre a saúde, intestino, e também sobre a população de bactérias do gênero *Bacillus* no intestino foi avaliado. O primeiro experimento demonstrou que a *M. piperita* e a *M. alternifolia* foram capazes de imunoestimular componentes da resposta humoral dos peixes (ativando o sistema complemento) e a *M. alternifolia* ainda foi capaz de alterar a morfologia intestinal (ocasionando aumento de suas vilosidades). O OE de *T. vulgaris* apresentou maior atividade antibacteriana quando comparado aos outros cinco OEs testados *in vitro*, e quando adicionado à dieta foi capaz de imunoestimular componentes da resposta celular dos peixes (incrementando o número de leucócitos e linfócitos). Além disso, apesar de



sua forte atividade antibacteriana, não foi capaz de alterar a população de bactérias benéficas do gênero *Bacillus* presentes no intestino. Em ambos experimentos *in vivo* as dietas suplementadas com OE não revelaram efeitos tóxicos aos peixes nas condições testadas. Baseado na revisão de literatura e nos resultados obtidos, conclui-se que, as suplementações com OEs foram seguras, apresentaram efeito imunoestimulante em diferentes componentes da resposta imune, puderam alterar em alguns casos a morfologia intestinal e parecem ter pouco impacto sobre a microbiota dos peixes.

Palavras-chave: aquicultura; fitoterápicos; hematologia; imunologia; melaleuca; menta; *Oreochromis niloticus*; tomilho.

## ABSTRACT

Essential oils (EOs) of plants are compounds studied as food additive in animal production a few years ago. They have already been described by several authors, as growth promoter, immunostimulant and antimicrobial. However, the effects of its addition on the diet of aquatic organisms are still poorly understood. In the present study, different supplementation strategies with different EOs were tested. In the first study, the EOs of *Mentha piperita* and *Melaleuca alternifolia* were supplied for a long period (2 months) in the diet of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, and aspects of health (hematological, biochemical and immunological parameters) and intestine (morphology and morphometry) were evaluated. In a second moment, *M. piperita*, *M. alternifolia*, *Citrus aurantium*, *Cymbopogon nardus*, *Ocimum basilicum* and *Thymus vulgaris* were tested in vitro against the intestinal isolates (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* and *Edwardsiella tarda*) from Nile tilapia to select the one with the greatest capacity to modulate the microbiota of fish. *Thymus vulgaris* EO was the one that presented the highest activity against the bacteria tested. In a final study, the *Thymus vulgaris* EO was provided for 15 days in the diet of Nile tilapia where its effects on the health, intestine and on the population of bacteria of the genus *Bacillus* were evaluated. In the first experiment, it was shown that *M. piperita* and *M. alternifolia* were able to immunostimulate components of fish humoral response (activating the complement system) and *M. alternifolia* was still able to alter intestinal morphology (increasing their villi). The *T. vulgaris* EO presented higher antibacterial activity when compared to five other EOs, and when added to the diet it was able to immunostimulate components of the cellular response of fish (increasing the number of leukocytes and lymphocytes). In addition, despite its strong antibacterial activity, it was not able to alter the population of beneficial bacteria of the genus *Bacillus* present in the intestine. In both *in vivo*

experiments, diets supplemented with EO showed no toxic effects on fish under the conditions tested. In conclusion, supplementation with EOs was safe, showed an immunostimulating effect on different components of the immune response, may in some cases alter the intestinal morphology and appear to have little impact on the fish microbiota.

Keywords: aquaculture; phytotherapics; hematology; immunology; melaleuca; mint; *Oreochromis niloticus*; thyme.

## Capítulo 1

### 1. Introdução

A criação de organismos aquáticos vem sendo estimulada no Brasil devido a seu grande potencial aquícola, culminando em maior crescimento a cada ano (IBGE, 2016). No entanto, pesquisadores têm mostrado que a intensificação desta cadeia produtiva (busca pelo máximo de produtividade com altas densidades de estocagem) afeta, direta ou indiretamente, o status sanitário da produção (Garcia et al., 2013).

Em virtude das dificuldades diárias no controle do ambiente de criação e do aparecimento de doenças, os produtores têm usado diferentes substâncias químicas e antimicrobianos não regulamentados para uso na aquicultura ou registrados para outras espécies animais, colocando em risco a produção, o ambiente aquático e a saúde do consumidor (Rico & Van den Brink, 2014). A fim de contornar os problemas associados à utilização de tais substâncias na aquicultura, os pesquisadores têm sido encorajados a encontrar soluções alternativas e preventivas, baseadas principalmente no estudo de aditivos alimentares, os quais podem agir benéficamente sobre a saúde dos animais. De fato, o conceito de manter a saúde dos peixes através da melhor nutrição possível é bem aceito na aquicultura moderna. Evidências científicas indicam claramente que os nutrientes alimentares, bem como os aditivos, têm a capacidade de estimular o sistema imunológico e proteger os peixes de doenças patogênicas. Apesar destas descobertas, as informações de suporte são escassas em comparação com o conhecimento existente para animais terrestres (Caipang & Lazado, 2015).

Dentre os diversos aditivos alimentares, os óleos essenciais (OEs) de plantas, que são compostos conhecidos por possuírem ampla atividade como antimicrobiano, imunostimulante e antioxidante, vêm se destacando por apresentarem efeitos benéficos sobre a saúde geral de animais e humanos. Como destacado e citado detalhadamente na

revisão abaixo, há algum tempo, a adição de OEs na dieta de suínos e aves de produção vem mostrando excelentes resultados sobre o desempenho produtivo, imunidade, saúde intestinal e resistência às doenças e, recentemente, alguns pesquisadores têm tido resultados promissores, sobre as mesmas características, em organismos aquáticos.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. *Uso de aditivos alimentares na aquicultura*

Os aditivos utilizados na produção animal são, segundo a instrução normativa 13/2004 (MAPA, 2004), substâncias, micro-organismos ou produtos formulados, adicionados intencionalmente na ração. Como não são utilizados normalmente como ingredientes, podem ou não conter valor nutritivo, mas são incluídos na formulação por influenciar propriedades físicas ou químicas da dieta, bem como afetar o desempenho dos animais ou melhorar a sua saúde (Dawood et al., 2017). Dentre os aditivos alimentares mais utilizados na aquicultura estão os prebióticos mananoligossacarídeos e glucanos (Carbone & Faggio, 2016), os probióticos *Bacillus* e *Lactobacillus* (Hai, 2015b), além dos produtos extraídos de plantas medicinais na forma de pó, extrato aquoso/etanólico e OEs (Hai, 2015a).

O uso destes aditivos na produção aquícola se destaca por fatores como a facilidade de aplicação e pelos efeitos benéficos ocasionados. Como exemplo, diversos autores já relataram incremento no desempenho produtivo (crescimento, peso e sobrevivência), benefícios em parâmetros hemato-imunológicos ou mudanças na morfologia e na microbiota intestinal de peixes alimentados com prebióticos (Akhter et al., 2015; Guerreiro et al., 2017; Wang et al., 2017), probióticos (Akhter et al., 2015; Hai, 2015a; Wang et al., 2017) e extratos de plantas medicinais (Hai, 2015b; Vallejos-Vidal et al., 2016; Sutili et al., 2017; Wang et al., 2017).

Um dos pontos de destaque que se busca ao utilizar um aditivo alimentar é o seu efeito imunoestimulante. Em recente revisão, Vallejos-Vidal et al. (2016) indicam que os imunoestimulantes têm sido utilizados na aquicultura tanto para melhorar a saúde dos animais, bem como para melhorar o desempenho produtivo. Os autores ainda destacam que um imunoestimulante pode ser natural ou sintético, estimulando o sistema imune por rotas específicas (vacinas) ou não específicas (sem especificidade antigênica). Dawood et al. (2017) destacaram que é extremamente relevante quando se encontra um efeito imunoestimulante sobre os parâmetros inatos (não específicos) dos peixes, pois este sistema de defesa apresenta ação contra qualquer patógeno. E segundo Ardó et al. (2008), este é o melhor método de prevenção de doenças (Ardó et al., 2008). Além disso, o melhor método de administração de substâncias imunoestimulantes para os peixes de todos os tamanhos, de modo eficaz, massivo e livre de estresse é adicionando-os à ração (Selvaraj et al., 2005) como um aditivo.

Dentre os produtos de plantas medicinais utilizados como aditivo alimentar na aquicultura, destacam-se os extratos aquosos e alcoólicos (Harikrishnan et al., 2011; Reverter et al., 2014), que são aqueles com maior volume de pesquisa. No entanto, o uso dos óleos essenciais (OEs) de plantas têm recebido destaque nos últimos anos (Sutili et al., 2017) e seus efeitos como aditivo ainda são pouco conhecidos quando comparado aos outros extratos.

## 2.2. *Óleos essenciais (OEs) de plantas*

Dentre os mais recentes aditivos utilizados na aquicultura estão os OEs (Sutili et al., 2017), que são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular extraídos de alguma parte da planta (folha, flor, caule e raiz). São líquidos caracterizados pelo forte odor e são extraídos, principalmente, pelo método de destilação e arraste a vapor

(Bakkali et al., 2008). Em extensa revisão, Raut & Karuppayil (2014) destacaram que o mercado de OE em todo o mundo é estimado em 700 milhões de dólares com aplicações potenciais em saúde e medicina; úteis na terapia de doenças infecciosas e não infecciosas; podendo os seus constituintes auxiliarem em novas abordagens de pesquisa terapêutica.

Os terpenóides e os fenilpropanóides são os principais constituintes dos OEs, sendo aqueles que geralmente proporcionam suas propriedades aromáticas e biológicas (Bakkali et al., 2008; Raut & Karuppayil, 2014). Na natureza, os OEs desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo o apetite por tais plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólenes e sementes, ou repelir outros indesejáveis (Bakkali et al., 2008).

Na área da saúde humana, os OEs são prescritos para a prevenção e tratamento de uma variedade de doenças, já que apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antimutagênicas, antidiabéticas, antivirais, antiinflamatórias, antiprotozoárias e antihelmínticas (Bakkali et al., 2008; Raut & Karuppayil, 2014).

Na produção animal os OEs têm sido utilizados principalmente devido aos efeitos benéficos no desempenho produtivo (Omonijo et al., 2017), sobrevivência e sobre o sistema imunológico (Zeng et al., 2015), sendo que na avicultura (Khan et al., 2012) e suinocultura (Omonijo et al., 2017), por exemplo, já são considerados uma alternativa viável ao uso de antimicrobianos.

Na aquicultura, os OEs têm sido pesquisados recentemente na água para o tratamento de parasitoses, bacterioses e viroses (Valladão et al., 2015), bem como aditivo alimentar imunostimulante e promotor de crescimento (Sutili et al., 2017). Eles

apresentam vantagem por serem substâncias naturais, biodegradáveis e com pouco potencial em causar resistência bacteriana (Bakkali et al., 2008; Yap et al., 2014). Ao contrário, o uso de desinfetantes e antibióticos de forma indiscriminada tem sido vista com criticismo pelos efeitos tóxicos aos animais, humanos e ambiente (Rico & Van den Brink, 2014).

Apesar de todas as características promissoras, o uso de OEs como um aditivo alimentar para peixes ainda foi pouco estudado, como mostrado em revisão recente de Sutili et al. (2017). Baseado nestas informações, alguns OEs foram incorporados à dieta de tilápia-do-Nilo e seus efeitos sobre a saúde e sobre o intestino foram testados neste estudo, com especial destaque para os OEs de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Thymus vulgaris*.

#### 2.2.1. *Melaleuca alternifolia* (árvore de chá)

O OE de *Melaleuca alternifolia* (família Myrtaceae), planta nativa da Austrália conhecida como árvore de chá, é usado como um antisséptico e desinfetante há décadas (Thomsen et al., 2011). Seu principal constituinte é o terpineol, responsável por sua ampla atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica antiparasitária (Carson et al., 2006), inseticida e repelente (Callander & James, 2012). Também já foi observada sua ação anti-inflamatória (Carson et al., 2006) e, em estudo *in vitro*, Kim et al. (2004) descreveram que esta planta apresenta elevada atividade antioxidante, sendo necessários estudos *in vivo* com animais e humanos.

Na produção animal, *M. alternifolia* causou alterações morfológicas intestinais positivas quando fornecida na dieta de suíno (Costa et al., 2011). Enquanto que, na piscicultura, o OE da *M. alternifolia* foi eficaz em tratar doenças parasitárias quando usado na água (Steverding et al., 2005; Al-Yaqout & Azad, 2010). No entanto, seu



efeito quando adicionado à dieta de peixes só foi estudado, até então, no presente trabalho.

### 2.2.2. *Mentha piperita* (Hortelã pimenta)

*Mentha piperita* é uma espécie do gênero *Mentha* (família Lamiaceae), que inclui cerca de 20 espécies com dispersão em todo o mundo. Plantas desta família são ricas em polifenólicos, sendo que grande parte delas são conhecidas por suas propriedades anti-microbianas (Oumzil et al., 2002) e alta atividade antioxidante (Stanisavljević et al., 2014).

O uso do OE de *M. piperita* na aquicultura foi efetivo em tratar parasitoses quando usado na água (Hashimoto et al., 2016; Malheiros et al., 2016). Somente em trabalhos recentes o seu uso foi experimentado na dieta de peixes. Ribeiro et al. (2016) mostraram que a inclusão de até 1,5% na ração de tambaqui *Colossoma macropomum* alterou os parâmetros hematológicos e bioquímicos, no entanto, os autores destacaram a necessidade de mais estudos para avaliar o seu potencial imunestimulante. Tais características foram estudadas aqui, além de seu efeito sobre a saúde intestinal do peixe, que era desconhecido.

### 2.2.3. *Thymus vulgaris* (tomilho)

*Thymus vulgaris*, conhecido como tomilho, é uma planta da família Lamiaceae, que é muito apreciada pelo seu efeito antisséptico, antimicrobiano, adstringente, anti-helmíntico, e desinfetante, sendo extremamente útil em casos de infecções intestinais variadas causadas por parasitos, bactérias gram positivas e gram negativas e fungos (Dauqan & Abdullah, 2017). As atividades biológicas e farmacológicas do tomilho são normalmente associadas ao seu principal componente, o timol (Dauqan & Abdullah,

2017), que é de grande interesse para a indústria de cosméticos, alimentos e produção animal. No entanto, o OE integro é composto por dezenas de componentes que atuam em sinergia resultando em diferentes efeitos promissores. Em revisão sobre o uso do tomilho na produção de aves, diversos autores já mostraram que esta planta pode ser uma alternativa efetiva ao uso de antimicrobianos (Khan et al., 2012).

Na aquicultura, os efeitos do OE de tomilho são mais conhecidos em relação aos outros OEs. Alguns autores demonstraram que ele aumenta a vida de prateleira do pescado quando adicionado às embalagens (Harpaz et al., 2003; Alçiçek, 2011) e tem forte atividade *in vitro* contra patógenos presentes na água e nos peixes (Mousavi et al., 2009; Navarrete et al., 2010; Mousavi et al., 2011).

A adição do OE de tomilho na dieta de peixes foi estudada em trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss* por Navarrete et al. (2010) que destacaram o efeito positivo sobre bactérias oportunistas, mas a necessidade de outros estudos sobre o seu efeito na microbiota. Esta suplementação também foi avaliada em douradas *Sparus aurata* por Sönmez et al. (2015a,b) que mostraram melhora do desempenho produtivo e na utilização de ácidos graxos, e por Hernández et al. (2015; 2016) que mostraram incremento no tempo de prateleira e efeito positivo no tecido intestinal dos animais. No presente trabalho, nós avaliamos o seu efeito imunestimulante e sobre as bactérias intestinais.

### 2.3. Aspectos gerais da saúde dos peixes

A saúde dos peixes tem sido estudada de forma interligada por três grandes áreas que são a hematologia, bioquímica e imunologia.

### 2.3.1. Hematologia

Dentro da hematologia, as principais análises a serem processadas são as quantificações totais e diferenciais das células sanguíneas. Com os resultados destas análises é possível descrever o número de células vermelhas, trombócitos, bem como leucócitos sanguíneos, os quais podem ser diferenciados em monócitos, linfócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos, a fim de comparar tratamentos. Isto é particularmente importante neste projeto, pois é conhecido que a dieta influencia significativamente na saúde de um organismo e são inúmeros os exemplos de que aditivos atuaram de forma significativa nos níveis das células sanguíneas de peixes como mostrado detalhadamente em revisão de Vallejos-Vidal et al. (2016).

A quantidade de eritrócitos e trombócitos circulantes reflete o estado de saúde dos peixes e podem ser utilizados a fim de avaliar o sistema imune em diferentes condições. Os leucócitos em particular estão relacionados aos principais mecanismos de defesa dos peixes, participando da fagocitose de agentes oportunistas, bem como da sinalização ao organismo para ativação de outros mecanismos de defesa (Esteban et al., 2015). Na Tabela 1, são evidenciados os trabalhos que avaliaram o efeito de dietas com OEs de plantas sobre a hematologia de peixes. É possível notar que os estudos são recentes e que mostraram diferentes resultados, dependendo da planta, da dose e do tempo de exposição avaliados. Apesar de escassos trabalhos, o OE de tomilho *Thymus vulgaris* se destaca por incrementar os níveis de leucócitos e linfócitos em *Carassius auratus gibelio* (Zadmajid & Mohammadi, 2017) e em tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (presente estudo).

Tabela 1. Revisão sobre o efeito da suplementação com óleos essenciais na hematologia de peixes.

Óleo essencial	Peixe	Resultado	Citação
<i>Citrus limon</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	0,5 e 0,75% por 60 dias aumentou significativamente o número de leucócitos.	Baba et al. (2016)
<i>Ocimum gratissimum</i> e <i>Zingiber officinale</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	0,5, 1 e 1,5% por 55 dias alteraram os níveis de células sanguíneas.	Brum et al. (2017)
<i>Mentha piperita</i> e <i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>O. niloticus</i>	100 e 250 mg/kg por 60 dias não influenciou a contagem de células sanguíneas.	Valladão et al. (2017)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Carassius auratus gibelio</i>	800 mg/kg por 6 semanas aumentou significativamente o número de leucócitos e linfócitos.	Zadmajid & Mohammadi (2017)

### 2.3.2. Bioquímica

Em relação aos parâmetros bioquímicos discutidos nesta tese, os valores de proteína total, albumina e globulina no soro dos peixes também podem ser alterados de acordo com a dieta e podem indicar o “status” de saúde do animal.

Segundo Wang et al. (2016), as proteínas totais do soro, incluindo as albuminas e as globulinas, desempenham um papel significativo na resposta imune dos peixes. A albumina sérica é relacionada à manutenção do equilíbrio osmótico do sangue circulante (Harper et al., 1997, Fazio et al., 2016) e ao transporte de metabólitos endógenos (ácidos graxos, hormônios e bilirrubina) (Fazio et al., 2016), enquanto que as globulinas são proteínas defensivas que incluem gamaglobulinas, uma variedade de enzimas e proteínas transportadoras (Fazio et al. 2016).

Ainda sobre os parâmetros bioquímicos, as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são transaminases importantes como indicadores de alterações metabólicas nos organismos (Barbosa et al. 2010), sendo particularmente eleitas para indicar possíveis danos ao tecido hepático. Uma vez que o metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e dos aditivos podem sobrecarregar a metabolização hepática, a análise destas enzimas se faz necessária. Apesar dos produtos de plantas serem substâncias naturais, qualquer molécula química que seja metabolizada pelo hospedeiro, pode, dependendo da dose e do tempo de administração, causar efeitos deletérios. Em revisão sobre o uso destas moléculas na aquicultura, Valladão et al. (2015) destacaram a necessidade de mais estudos sobre tais efeitos. Na Tabela 2 foram destacados os estudos que avaliaram os parâmetros bioquímicos em peixes alimentados com óleos essenciais, sendo que de nosso conhecimento, o efeito de dietas com óleos essenciais sobre as transaminases ainda tem sido pouco avaliado.

Tabela 2. Revisão sobre o efeito da suplementação com óleos essenciais nos parâmetros bioquímicos de peixes.

Óleo essencial	Peixe	Resultado	Citação
<i>Citrus sinensis</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	0,3 e 0,5% por 90 dias elevou os níveis de proteínas totais e globulina.	Acar et al. (2015)
<i>Citrus limon</i>	<i>O. mossambicus</i>	0,5% por 60 dias elevou os níveis de proteínas totais.	Baba et al. (2016)
<i>Cinnamomum</i> sp.	<i>Oreochromis niloticus</i>	0,15% por 71 dias elevou os níveis de proteínas totais.	Santos et al. (2016)
<i>Mentha piperita</i> e <i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>O. niloticus</i>	100 e 250 mg/kg por 60 dias não alterou os níveis de proteínas totais e albumina.	Valladão et al. (2017)
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	0,25 e 2 ml/kg por 21 dias não alterou glicose nem os níveis das aminotransferases.	Zeppenfeld et al. (2017)
<i>Ocimum gratissimum</i> e <i>Zingiber officinale</i>	<i>O. niloticus</i>	0,5, 1 e 1,5% por 55 dias não alterou os níveis de glicose, proteína e imunoglobulina.	Brum et al. (2018)

### 2.3.3. Imunologia

Dentre as diversas análises imunológicas, as atividades da explosão respiratória dos leucócitos (“burst”), da lisozima e do sistema complemento foram analisadas e discutidas nesta tese.

A explosão respiratória é parte da resposta imune contra infecção por patógenos e envolve a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais são tóxicas para os microrganismos fagocitados (Musthafa et al., 2017). Devido a sua utilidade como indicadora de resposta não específica de defesa, esta análise é considerada como uma boa ferramenta para estudo da atividade antimicrobiana sanguínea do hospedeiro (Biller-Takahashi et al., 2013).

O sistema complemento é considerado a principal linha de defesa antimicrobiana da imunidade inata em peixes (Srivastava & Pandey, 2015). Este sistema é vital ao hospedeiro, especialmente no início da infecção, antes da imunidade adaptativa ser ativada, e também é crucial para o recrutamento de fagócitos, depuração de agentes patogênicos invasores e eliminação de células alteradas (Jiang et al., 2015). Detalhadamente, o sistema inicia com a identificação de superfícies patogênicas, o que leva à geração de potentes mediadores inflamatórios (anafilatoxinas) e ativação de um mecanismo fundamental de opsonização (revestimento) da superfície patogênica, e lise direcionada por meio da formação de poros na membrana do patógeno, conhecida como complexo de ataque de membrana (Vallejos-Vidal et al., 2016). Descobertas mostraram que o sistema complemento também desempenha um papel importante na imunidade adaptativa, ajudando na geração de anticorpos pelas células B (Merle et al., 2015). O sistema complemento pode ser ativado através de três caminhos principais: via clássica, via da lectina e a via alternativa (hidrólise espontânea/superfícies patogênicas), sendo esta última a mais avaliada nos estudos de imunologia na aquicultura.

A lisozima é uma enzima bacteriolítica presente no muco, tecidos linfóides, plasma e outros fluídos, distribuída em diferentes órgãos (Uribe et al., 2011; Srivastava & Pandey, 2015) e compõe um dos principais mecanismos de defesa inespecífico dos peixes (Uribe et al., 2011). Sua ação bactericida tem sido associada à hidrolise do peptidoglicano da parede celular das bactérias Gram-positivas, resultando em lise celular, no entanto, descobriu-se que também é capaz de lisar bactérias Gram-negativas (Uribe et al., 2011). Esta é uma das enzimas mais usadas para avaliar a melhoria da imunidade inata em experimentos que estudam os efeitos imunoestimulantes de aditivos alimentares (Vallejos-Vidal et al., 2016), pois além das atividades descritas, também é conhecida por ser uma opsonina, auxiliando na ativação do sistema complemento e na atuação de células fagocíticas (Magnadóttir, 2006). O promissor efeito imunoestimulante dos OEs para peixes foi estudado por alguns autores e destacado na Tabela 3.



Tabela 3. Revisão sobre o efeito da suplementação com óleos essenciais na imunologia de peixes.

Óleo essencial	Peixe	Resultado	Citação
<i>Citrus sinensis</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	0,1, 0,3 e 0,5% por 90 dias elevaram os níveis de lisozima.	Acar et al. (2015)
<i>Citrus limon</i>	<i>O. mossambicus</i>	0,5, 0,75 e 1% por 60 dias elevaram os níveis de lisozima.	Baba et al. (2016)
<i>Cinnamomum</i> sp.	<i>Oreochromis niloticus</i>	0,05, 0,1, 0,15 e 0,2% por 71 dias não alteraram os níveis de lisozima.	Santos et al. (2016)
<i>Ocimum americanum</i>	<i>Sciaenops ocellatus</i>	0,25, 0,5, 1 e 2 g/kg por 7 semanas ativaram o sistema complemento.	Sutili et al. (2016)
<i>Mentha piperita</i> e <i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>O. niloticus</i>	100 e 250 mg/kg por 60 dias ativaram o sistema complemento.	Valladão et al. (2017)
<i>Zingiber officinale</i>	<i>O. niloticus</i>	1% por 35 dias aumentou os níveis de lisozima.	Brum et al. (2018)

#### 2.4. *Saúde intestinal*

O intestino desempenha um papel importante para os animais de produção, pois atua diretamente sobre a digestão e absorção de nutrientes, mas também tem função relevante no sistema imunológico (Nicholson et al., 2012).

Muitas doenças infecciosas são iniciadas através da colonização da mucosa intestinal pelas bactérias patogênicas e a eficiência da barreira intestinal contra essas bactérias depende da produção de muco, da integridade epitelial e da presença e balanço entre as bactérias comensais, as quais mantêm a homeostase intestinal e a saúde dos peixes (Torrecillas et al., 2012). Isto é particularmente importante na piscicultura, já que os peixes ingerem o alimento na água, que mantém contato íntimo com diferentes microrganismos oportunistas e excretas.

O uso de aditivos alimentares pode promover um aumento das vilosidades, o que é associado à melhor eficiência, ao aproveitamento da ração e à uma excelente saúde intestinal (Giannenas et al., 2011). O animal que aproveita melhor o nutriente de uma ração, conseqüentemente, terá um incremento em seu status sanitário, o que pode resultar em maior resistência aos desafios próprios dos sistemas de criação intensivos, além de melhorar o desempenho produtivo.

##### 2.4.1. *Morfologia intestinal*

A morfologia do intestino, estudada a partir da histologia do órgão, é de extrema importância para indicar o aumento da absorção de nutrientes, eletrólitos e fluídos do lúmen intestinal. No entanto, o epitélio também apresenta outra função crítica, servindo como uma barreira para evitar a passagem de substâncias nocivas dentro do lúmen intestinal, tais como antígenos e outras toxinas (Sundh & Sundell, 2015). A Figura 1 ilustra em detalhe a complexa interação no tecido intestinal.

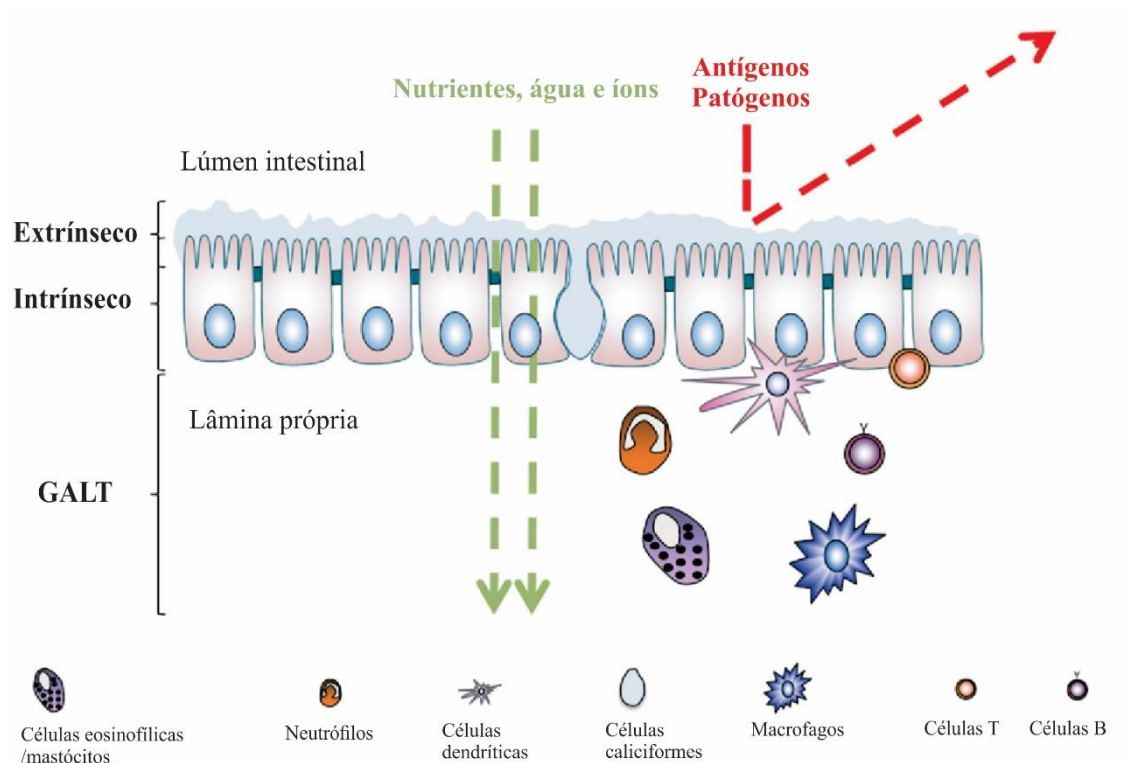


Figura 1. Barreira intestinal: composta por uma camada simples de células epiteliais, lâmina própria e camada muscular, que protegem o órgão contra antígenos e permitem a absorção de nutrientes. É destacada também a presença das diferentes células no intestino. Adaptado de Sundh & Sundell (2015).

Em relação aos aspectos imunológicos do intestino, destaque é dado ao tecido linfóide associado ao intestino (GALT), que engloba granulócitos residentes, macrófagos, linfócitos e células plasmáticas (leucócitos da lâmina própria) e células T e B entre as células epiteliais (linfócitos intra-epiteliais). Estas células, juntamente com as células caliciformes e células neuroendócrinas, produzem e regulam as respostas imunes intestinais (Vallejos-Vidal et al., 2016).

Alguns autores já observaram que peixes alimentados com dieta contendo imunostimulante apresentaram uma resposta imune intestinal localizada, com a observação histológica de aumento de linfócitos na camada epitelial, o que pode sugerir uma maior resistência desses peixes aos patógenos oportunistas presentes no trato

intestinal (Kühlwein et al., 2013). Na tabela 4 são apontados os dois recentes trabalhos que estudaram o efeito dos OEs na morfologia intestinal, sendo ambos benéficos e promissores.

#### 2.4.2. Microbiota intestinal

Todos os vertebrados mantêm diversificadas comunidades de microrganismos gastrointestinais autóctones, os quais desempenham papel importante na nutrição, desenvolvimento de tecidos do hospedeiro, resposta imunológica e proteção contra patógenos oportunistas (Nicholson et al., 2012).

A microbiota dos peixes é caracterizada por uma enorme variedade de microrganismos aeróbios, anaeróbios, benéficos e oportunistas que interagem entre si, e a colonização microbiana, o estabelecimento, composição e diversidade no trato é um processo complexo e é reflexo da composição microbiana da água, do tipo de dieta fornecida aos peixes e do ambiente (Nayak, 2010). Entre os principais grupos de bactérias em peixes, estão os normalmente benéficos *Bacillus* (Olmos et al., 2014) e os potenciais oportunistas *Aeromonas* e *Pseudomonas* (Al-Harbi & Uddin, 2005).

Em estudos prévios, diversos autores relataram efeitos benéficos do uso de aditivos alimentares sobre a microbiota de peixes (Giannenas et al., 2012; Carda-Diéquez et al., 2014; Hoseinifar et al., 2014), no entanto, pouco se conhece sobre os efeitos dos OEs sobre as bactérias intestinais. Os escassos estudos encontrados na literatura foram destacados na Tabela 5 e, somente recentemente, Al-Sagheer et al. (2017) descreveram que os OEs apresentam efeito modulador da microbiota de peixes.

Tabela 4. Revisão sobre o efeito da suplementação com óleos essenciais na morfologia intestinal de peixes.

Óleo essencial	Peixe	Resultado	Citação
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	2 mL/kg por 60 dias aumentaram as dobras intestinais.	Zeppenfeld et al. (2016)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	250 mg/kg por 60 dias aumentou o comprimento dos vilos.	Valladão et al. (2017)

Tabela 5. Revisão sobre o efeito da suplementação com óleos essenciais na microbiota de peixes.

Óleo essencial	Peixe	Resultado	Citação
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	5, 10 and 20 mg/kg por 5 semanas não alterou a microbiota.	Navarrete et al. (2010)
<i>Ocimum americanum</i>	<i>Sciaenops ocellatus</i>	0,25, 0,5, 1 e 2 g/kg por 7 semanas não alterou a microbiota.	Sutili et al. (2016)
<i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Pelargonium graveolens</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	400 mg/kg por 12 semanas diminuíram o número de bactérias totais, coliformes, <i>Escherichia coli</i> e <i>Aeromonas</i> spp..	Al-Sagheer et al. (2017)

### 2.5. *Status da produção atual: tilapicultura*

A tilápia-do-Nilo, peixe criado intensivamente em todo o mundo, é atualmente a principal espécie da piscicultura brasileira, correspondendo aproximadamente a metade de toda a nossa produção (Valladão et al., 2016).

A criação desta espécie enfrenta importantes entraves sanitários devido à problemas associados à intensificação do seu cultivo, como elevada densidade, manejo inadequado e má qualidade de água. Garcia et al. (2013) discutiram em detalhes os problemas da intensificação (alta taxa de estocagem, elevados níveis de estresse e diminuição dos níveis de oxigênio na água) para o crescimento dos peixes, para o bem-estar e sobrevivência. Além disso, o desenvolvimento de parasitoses e bacterioses (Shoemaker et al., 2008) é favorecido cada vez mais com a intensificação, o que culmina em surtos de mortalidades nas pisciculturas.

Alguns estudos têm abordado a adição de substâncias na ração com efeitos benéficos sobre a saúde geral (Ardó et al., 2008; Ngamkala et al., 2010; Brum et al., 2017; Valladão et al., 2017; Brum et al., 2018) e intestinal (Welker et al., 2012; Valladão et al., 2017) desta espécie como forma de promover melhora do desempenho produtivo, imunostimulação, além de resistência dos peixes ao estresse e aos patógenos recorrentes na produção. No entanto, o efeito de OEs sobre tais parâmetros na tilápia ainda é pouco conhecido, sendo que nesta revisão apenas cinco trabalhos (Tabela 1, 2, 3, 4 e 5) foram encontrados na literatura.

### 3. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de diferentes OEs, em dois períodos de suplementação, curto e longo, sobre a saúde geral (hematologia, parâmetros bioquímicos e imunológicos) e

intestinal (morfologia e microbiota) da tilápia-do-Nilo, além de atividade *in vitro* contra isolados intestinais.

#### 4. Referências

Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., 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.

Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 733-741.

Alçiçek, Z. (2011). The effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil concentration on liquid-smoked vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) fillets during chilled storage. *Food Chemistry*, 128(3), 683-688.

Al-Harbi, A. H., & Uddin, N. (2005). Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 250(3), 566-572.

Al-Sagheer, A. A., Mahmoud, H. K., Reda, F. M., Mahgoub, S. A., & Ayyat, M. S. (2017). Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquaculture Nutrition*. doi: 10.1111/anu.12637

Al-Yaqout, A., & Azad, I. S. (2010). Antiparasitic Effects of Some Essential Oils on the Scuticociliate, *Uronema* sp. *Research Journal of Biotechnology*, 5(4), 20-25.

Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Váradi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., & Jeney, G. (2008). Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance

the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 275(1), 26-33.

Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O. S., & 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.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.

Barbosa, A. D. A., Müller, E. S., Moraes, G. H. K. D., Umigi, R. T., Barreto, S. L. D. T., & Ferreira, R. M. (2010). Perfil da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e biometria do fígado de codornas japonesas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(2), 308-312.

Biller-Takahashi, J. D., Takahashi, L. S., Saita, M. V., Gimbo, R. Y., & Urbinati, E. C. (2013). Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, 73(2), 425-429.

Brum, A., Pereira, S. A., Cardoso, L., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mouriño, J. L. P., & Martins, M. L. (2018). Blood biochemical parameters and melanomacrophage centers in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger. *Fish & Shellfish Immunology*. doi: 10.1016/j.fsi.2018.01.021.

Brum, A., Pereira, S. A., Owatari, M. S., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mouriño, J. L. P., & Martins, M. L. (2017). Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 468, 235-243.



Caipang, C. M. A., & Lazado, C. C. (2015). Nutritional impacts on fish mucosa: immunostimulants, pre-and probiotics. *Mucosal health in aquaculture* (pp. 211-272). Academic Press San Diego.

Callander, J. T., & James, P. J. (2012). Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. *Veterinary Parasitology*, 184(2), 271-278.

Carbone, D., & Faggio, C. (2016). Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 172-178.

Carda-Diéguez, M., Mira, A., & Fouz, B. (2013). Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiology Ecology*, 87, 451-459.

Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 50-62.

Costa, L. B., Berenchtein, B., Almeida, V. V., Tse, M. L. P., Braz, D. B., Andrade, C., Mourão, G. B., & Miyada, V.S. (2011). Phytogetic additives and sodium butyrate as growth promoters of weaned piglets. *Archivos de Zootecnia*. 60, 687-698.

Dauqan, E. M., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(2), 17-22.

Dawood, M. A., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2017). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*. doi: 10.1111/raq.12209

Esteban, M. Á., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., & Meseguer, J. (2015). Phagocytosis in teleosts. Implications of the new cells involved. *Biology*, 4(4), 907-922.

Fazio, F., Marafioti, S., Sanfilippo, M., Casella, S., & Piccione, G. (2016). Assessment of immune blood cells and serum protein levels in *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758), *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) and *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) collected from the Tyrrhenian sea coast (Italy). *Cahiers de Biologie Marine*, 57(3), 235-240.

Garcia, F., Romera, D. M., Gozi, K. S., Onaka, E. M., Fonseca, F. S., Schalch, S. H., Candeira, P. G., Guerra, L. O. M., Carmo, F. J., Carneiro, D. J., Martins, M. I. E. G., & Portella, M. C. (2013). Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. *Aquaculture*, 410, 51-56.

Giannenas, I., Triantafyllou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T., & Karagouni, E. (2012). Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350, 26-32.

Giannenas, I., Tsalie, E., Chronis, E., Mavridis, S., Tontis, D., & Kyriazakis, I. (2011). Consumption of *Agaricus bisporus* mushroom affects the performance, intestinal microflora composition and morphology, and antioxidant status of turkey poults. *Animal Feed Science and Technology*, 165, 218–229.

Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., & Enes, P. (2017). Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. doi: 10.1111/raq.12201.

Hai, N. V. (2015a). Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: a review. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 592-597.

Hai, N. V. (2015b). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. *Aquaculture*, 446, 88-96.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1), 1-15.

Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., & Gelman, A. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, 66(3), 410-417.

Harper H.A., Rodwell V.W., & Mayes P.A. (1997). Review of physiological chemistry. Lange medical publications, Los Anglos.

Hashimoto, G. S. O., Neto, F. M., Ruiz, M. L., Acchile, M., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Martins, M. L. (2016). Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture*, 450, 182-186.

Hernández, A., García, B. G., Caballero, M. J., & Hernández, M. D. (2016). The inclusion of thyme essential oil in the feed of gilthead seabream (*Sparus aurata*) promotes changes in the frequency of lymphocyte aggregates in gut-associated lymphoid tissue. *Aquaculture Research*, 47, 3341-3345.

Hernández, A., García, B. G., Jordán, M. J., & Hernández, M. D. (2015). Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition*, 21(5), 740-749.

Hoseinifar, S. H., Sharifian, M., Vesaghi, M. J., Khalili, M., & Esteban, M. Á. (2014). The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(2), 231-236.

- IBGE (2015). Produção da pecuária Municipal 2016. Rio de Janeiro: IBGE.
- Jiang, C., Zhang, J., Yao, J., Liu, S., Li, Y., Song, L., Li, C., Wang, X., & Liu, Z. (2015). Complement regulatory protein genes in channel catfish and their involvement in disease defense response. *Developmental & Comparative Immunology*, 53(1), 33-41.
- Khan, R. U., Naz, S., Nikousefat, Z., Tufarelli, V., & Laudadio, V. (2012). *Thymus vulgaris*: alternative to antibiotics in poultry feed. *World's Poultry Science Journal*, 68(3), 401-408.
- Kim, H. J., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, H. Y., & Jin, Z. (2004). Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2849-2854.
- Kühlwein, H., Emery, M. J., Rawling, M. D., Harper, G. M., Merrifield, D. L., & Davies, S. J. (2013). Effects of a dietary  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 115(5), 1091-1106.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 137-151.
- Malheiros, D. F., Maciel, P. O., Videira, M. N., & Tavares-Dias, M. (2016). Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture*, 455, 81-86.
- MAPA. (2004). Instrução Normativa nº 13. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692>. Acessado em: 15/01/2018.

Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement system part II: role in immunity. *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2015.00257

Mousavi, S. M., Mirzargar, S. S., Mousavi, H. E. Z., Baigi, R. O., Khosravi, A., Bahonar, A., & Ahmadi, M. (2009). Evaluation of Antifungal activity of new combined essential oils in comparison with malachite green on hatching rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 4(2), 103-110.

Mousavi, S. M., Wilson, G., Raftos, D., Mirzargar, S. S., & Omidbaigi, R. (2011). Antibacterial activities of a new combination of essential oils against marine bacteria. *Aquaculture International*, 19(1), 205-214.

Musthafa, M. S., Ali, A. R. J., Kumar, M. S. A., Paray, B. A., Al-Sadoon, M. K., Balasundaram, C., & Harikrishnan, R. (2017). Effect of *Cucurbita mixta* (L.) seed meal enrichment diet on growth, immune response and disease resistance in *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 68, 509-515.

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. *Aquaculture Research*, 41(10), 667-678.

Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553-1573.

Ngamkala, S., Futami, K., Endo, M., Maita, M., & Katagiri, T. (2010). Immunological effects of glucan and *Lactobacillus rhamnosus* GG, a probiotic bacterium, on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* intestine with oral *Aeromonas* challenges. *Fisheries Science*, 76(5), 833-840.

Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J., Burcelin R., Gibson G., Jia W. & Pettersson S. (2012) Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336(6086), 1262-1267.

Olmos, J., & Paniagua-Michel, J. (2014). *Bacillus subtilis* a potential probiotic Bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 6, 361-365.

Omonijo, F. A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., & Yang, C. (2017). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*. doi: 10.1016/j.aninu.2017.09.001

Oumzil, H., Ghouami, S., Rhajaoui, M., Iidirissi, A., Fkih-Tetouani, S., Faid, M., & Benjouad, A. (2002). Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytotherapy Research*, 16(8), 727-731.

Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264.

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.

Ribeiro, S. C., Castelo, A. S., silva, B. M. P. D., Cunha, A. D. S., Proietti Junior, A. A., & Oba-Yoshioka, E. T. (2016). Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Acta Amazonica*, 46(1), 99-106.

Rico, A., & Van den Brink, P. J. (2014). Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. *Science of the Total Environment*, 468, 630-641.

Santos, W. M., de Brito, T. S., Prado, S. D. A., de Oliveira, C. G., De Paula, A. C., de Melo, D. C., & Ribeiro, P. A. (2016). Cinnamon (*Cinnamomum* sp.) inclusion in diets for Nile tilapia submitted to acute hypoxic stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 551-555.

Selvaraj, V., Sampath, K., & Sekar, V. (2005). Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 19(4), 293-306.

Sharifuzzaman, S. M., Al-Harbi, A. H., & Austin, B. (2014). Characteristics of growth, digestive system functionality, and stress factors of rainbow trout fed probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2. *Aquaculture*, 418, 55-61.

Shoemaker, C. A., Xu, D., Klesius, P. H., & Evans, J. J. (2008). Concurrent infections (Parasitism and bacterial disease) in Tilapia. *Proceedings of the 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, 12-14).

Sönmez, A. Y., Bilen, S., Alak, G., Hisar, O., Yanık, T., & Biswas, G. (2015a). Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(1), 165-175.

Sönmez, A. Y., Bilen, S., Albayrak, M., Yılmaz, S., Biswas, G., Hisar, O., & Yanık, T. (2015b). Effects of dietary supplementation of herbal oils containing 1, 8-cineole, carvacrol or pulegone on growth performance, survival, fatty acid composition, and liver and kidney histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15, 813-819.

Srivastava, P. K., & Pandey, A. K. (2015). Role of immunostimulants in immune responses of fish and shellfish. *Biochemical and Cellular Archives*, 15, 47-73.

Stanisavljević, D., Đorđević, S., Milenković, M., Lazić, M., Veličković, D., Randelović, N., & Zlatković, B. (2014). Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oils Obtained from *Mentha longifolia* L. Hudson, Dried by Three Different Techniques. *Records of Natural Products*, 8(1), 61-65.

Steverding, D., Morgan, E., Tkaczynski, P., Walder, F., & Tinsley, R. (2005). Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp. infection of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66(1), 29-32.

Sundh, H., & Sundell, K. S. (2015). Environmental impacts on fish mucosa (pp. 171-197). Academic Press.

Sutili, F. J., Gatlin, D. M., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2017). Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*. doi: 10.1111/raq.12197

Sutili, F. J., Velasquez, A., Pinheiro, C. G., Heinzmann, B. M., Gatlin, D. M., & Baldisserotto, B. (2016). Evaluation of *Ocimum americanum* essential oil as an additive in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Fish & Shellfish Immunology*, 56, 155-161.

Thomsen, P. S., Jensen, T. M., Hammer, K. A., Carson C. F., Mølgaard P., & Riley, T. V. (2011). Survey of the antimicrobial activity of commercially available Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil products in vitro. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 17(9), 835-841.

Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Dhanasiri, A. K., Sweetman, J., & Izquierdo, M. (2012). Effects on mortality and stress response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure. *Journal of Fish Diseases*, 35(8), 591-602.

Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56(10), 486-503.



Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., & Pilarski, F. (2015). Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38(5), 417-428.

Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., & Pilarski, F. (2016). South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. doi: 10.1111/raq.12164.

Valladão, G. M., Gallani, S. U., Pala, G., Jesus, R. B., Kotzent, S., Costa, J. C., Silva, T. S. A., & Pilarski, F. (2017). Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquaculture Research*, 48(11), 5640-5649.

Vallejos-Vidal, E., Reyes-López, F., Teles, M., & MacKenzie, S. (2016). The response of fish to immunostimulant diets. *Fish & Shellfish Immunology*, 56, 34-69.

Wang, E., Chen, X., Wang, K., Wang, J., Chen, D., Geng, Y., Lai, W., & Wei, X. (2016). Plant polysaccharides used as immunostimulants enhance innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 59, 196-202.

Wang, W., Sun, J., Liu, C., & Xue, Z. (2017). Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquaculture Research*, 48(1), 1-23.

Welker, T. L., Lim C., Yildirim-Aksoy M., & Klesius P. H. (2012). Use of Diet Crossover to Determine the Effects of beta-glucan Supplementation on Immunity and Growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of The World Aquaculture Society*, 76(5), 833-840.

Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8, 6-14.

Zadmajid, V., & Mohammadi, C. H. (2017). Dietary thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) changes serum stress markers, enzyme activity, and hematological parameters in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to silver nanoparticles. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 16(3), 1063-1084.

Zeng, Z., Zhang, S., Wang, H., & Piao, X. (2015). Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. Journal of Animal Science and Biotechnology, 6(1), 7.

Zeppenfeld, C. C., Hernández, D. R., Santinón, J. J., Heinzmann, B. M., Cunha, M. A., Schmidt, D., & Baldisserotto, B. (2016). Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Aquaculture Nutrition, 22(4), 933-940.

Zeppenfeld, C. C., Saccol, E. M. H., Pês, T. S., Salbego, J., Koakoski, G., Santos, A. C., Heinzmann B.M., Cunha M.A., Barcellos L.J.G., Pavanato M.A., Caron B.O., Baldisserotto B. (2017). *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen*—Stress and antioxidant parameters. Aquaculture Nutrition, 23, 1362-1267.

## Capítulo 2 - Manuscrito publicado no periódico “Aquaculture research”

Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia

Gustavo Moraes Ramos Valladão<sup>1</sup>, Sílvia Umeda Gallani<sup>1</sup>, Gabriela Pala<sup>1</sup>, Raphael Barbeta de Jesus<sup>1</sup>, Suzana Kotzent<sup>1,2</sup>, Jaqueline Custódio da Costa<sup>1</sup>, Thiago Fernandes Alves da Silva<sup>1</sup> and Fabiana Pilarski<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Post-graduate program in Aquaculture, Laboratory of Microbiology and Parasitology of Aquatic Organisms, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, SP, Brazil, 14870

<sup>2</sup> Post-graduate program in Agricultural Microbiology, Laboratory of Parasitology and Microbiology of Aquatic Organisms, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, SP, Brazil, 14870

\*Corresponding author at:

E-mail: [fabianap@caunesp.unesp.br](mailto:fabianap@caunesp.unesp.br)

Running title: Essential oils as a feed additive for Nile tilapia.

## Abstract

The effect of the essential oils (EOs) of peppermint, *Mentha piperita* L., and tea tree, *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel, on the hematological, biochemical, and immunological parameters and intestinal morphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., were evaluated. Fish ( $58.09 \pm 5.87$  g) were fed  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  of each EO and sampled on days 7, 14, 30 and 60 after starting supplementation. The hematological and biochemical parameters were not altered by the supplementation of EOs compared to the control ( $p > 0.05$ ). With regard to the immunological parameters, the activation of the complement system of fish fed  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  peppermint and  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  tea tree EOs were significantly higher compared to the control after 60 days of feeding ( $p < 0.05$ ). The complement system plays an essential role in innate immunity and contributes significantly to the acquired immune response; thus, its activation through supplementation with EOs is promising for the formulation of nutritional additives in aquaculture. Regarding intestinal morphology, fish fed  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  tea tree EO presented higher villus size compared to all other groups ( $p < 0.05$ ), which represents a healthier gut. These fish present a larger intestinal surface, which can result in better absorption and utilization of the nutrients. Based on the responses found in this study, both EOs were considered promising for the formulation of feed additives for Nile tilapia.

**Keywords:** aquaculture; immunostimulant; phytotherapy; plant extract; *Mentha piperita*; *Melaleuca alternifolia*

## Introduction

Aquaculture intensification culminates in sanitary barriers that can affect production. Due to the emergence of diseases, fish farmers have made use of different chemicals and antibiotics, which may pose a risk to the aquatic environment and consumer health (Rico & Van den Brink 2014). To overcome the problems associated with the use of such substances, researchers have been encouraged to find alternative and preventive solutions, based mainly on the use of feed additives (Encarnação 2015). Among various feed additives, herbal medicines have been highlighted by several authors for promoting beneficial effects on the hemato-immunological parameters and intestinal health of aquatic animals (Galina, Yin, Ardo & Jeney 2009; Citarasu 2010; Chakraborty & Hancz, 2011; Harikrishnan, Balasundaram & Heo 2011; Reverter, Bontemps, Lecchini, Banaigs & Sasal 2014).

Regarding the herbal medicines studied here, the tea tree, *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel, is known for its powerful antiseptic effect (Thomsen, Jensen, Hammer, Carson, Mølgaard & Riley 2011). Recently, the essential oil (EO) of the tea tree has been described to have promising antiparasitic and bactericidal action against fish pathogens when used in water (Steverding, Morgan, Tkaczynski, Walder & Tinsley 2005; Valladão, Gallani, Ikefuti, Cruz, Levy-Pereira, Rodrigues & Pilarski 2016). However, to the best of our knowledge, the use of tea tree EO in the diet and its effect on the general status of healthy fish and intestinal mucosa is unknown. Peppermint, *Mentha piperita* L., is known to have beneficial effects on gastrointestinal tissue, immunomodulating actions and chemopreventive potential (McKay & Blumberg 2006). Recently, some authors have shown that peppermint EO has antiparasitic effect against *Ichthyophthirius multifiliis* (Valladão et al., 2016) and monogeneans (Hashimoto, Neto, Ruiz, Acchile, Chagas, Chaves, Martins 2016; Malheiros, Maciel, Videira & Tavares-

Dias 2016; Costa, Valladão, Pala, Gallani, Kotzent, Crotti, Fracarolli, Silva & Pilarski 2017), and when used in water did not cause negative effects on fish hematology (Hashimoto et al., 2016). The enhancement of hematological and immune parameters was observed in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) (Adel, Pourgholam, Zorriehzahra & Ghiasi 2016), and Caspian white fish, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii) (Adel, Amiri, Zorriehzahra, Nematollahi & Esteban 2015), fed with ethanolic extract of peppermint, and in Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), fed with a powder of peppermint leaves (Talpur 2004). Recently, Ribeiro, Castelo, Silva, Cunha, Proietti-Junior & Oba-Yoshioka (2016) reported that the EO of this plant alters hematological and biochemical parameters of black pacu, *Colossoma macropomum* (Cuvier), when added to its diet. To the best of our knowledge, no results were found regarding the effect of peppermint on fish intestinal health.

Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., is one of the main species produced in captivity worldwide. Tilapia farming, however, faces significant health barriers, which culminate in mortality outbreaks. Some studies have addressed the use of different additives in the feed of Nile tilapia, aiming their beneficial effects toward the intestinal mucosa (Welker, Lim, Yildirim-Aksoy & Klesius 2012) and the improvement of overall health (Ngamkala, Futami, Endo, Maita & Katagiri 2010). Although tilapia stands out in aquaculture, the effects of EOs on its gut mucosa and health are little known.

This study explores the possible effects of supplementation with peppermint and tea tree EOs on the hematological, biochemical, and immunological parameters and its influence on the intestinal morphology of Nile tilapia.

## Material and Methods

### *Fish and study design*

Nile tilapia fingerlings were purchased from a commercial fish farm and kept in 500 L tanks with constant aeration and open water flow (200 L h<sup>-1</sup>) for acclimation for two months. During this period, no signs of disease or abnormal behavior were observed. Four hundred fish (58.09 ± 5.87 g) were distributed randomly and equally (20 fish per tank) in 20 tanks (500 L), which were randomly divided into 5 groups, with one being the group control, two groups supplemented with peppermint EO (100 and 250 mg kg<sup>-1</sup>) and two groups supplemented with tea tree EO (100 and 250 mg kg<sup>-1</sup>), each with 4 replicates.

The source of water was the same for all tanks. The temperature, pH and dissolved oxygen were measured weekly in all groups using pH 100 and YSI 55 probes. All parameters were appropriate for fish maintenance and did not differ between groups (Table 1).

Table 1. Water parameters of fish in the control group and the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*).

Group	Temperature (°C)	Dissolved oxygen (mg L <sup>-1</sup> )	pH
Control	29.22 ± 0.50	4.87 ± 0.61	7.49 ± 0.15
Peppermint (100 mg kg <sup>-1</sup> )	29.58 ± 0.25	5.03 ± 0.43	7.51 ± 0.15
Peppermint (250 mg kg <sup>-1</sup> )	29.38 ± 0.49	5.16 ± 0.36	7.47 ± 0.11
Tea tree (100 mg kg <sup>-1</sup> )	29.38 ± 0.57	4.88 ± 0.27	7.47 ± 0.12
Tea tree (250 mg kg <sup>-1</sup> )	29.32 ± 0.35	5.03 ± 0.39	7.50 ± 0.14

\* Different letters indicate significant differences between the means of the treatments.

All experimental procedures were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee (CEBEA) of the School of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil, under protocol number 13019/15. The approval was consistent with the ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

#### *Herbal medicines and diet*

Pure EOs of tea tree and peppermint were purchased from Phytoterapica<sup>®</sup> (São Paulo, Brazil). Both EOs were subjected to gas chromatography (GC) with flame ionization detector (FID) using an Agilent HP 7820A system for the identification and quantification of their constituents. In details, separations were carried out in Agilent-fused silica capillary HP-5 columns (30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ). The GC temperature was as follows: an initial 50°C and then an increase of 3°C min<sup>-1</sup> to 200°C, with injector temperature at 200 °C, injection volume 1  $\mu\text{L}$ , split ratio adjusted at 50:1, and FID detector temperature at 220 °C. Separated compounds (%) were calculated from GC-FID areas using EZChrom Elite Compact software. GC/mass spectrometry (MS) analyses were performed using a Shimadzu QP2010 ULTRA system to confirm the GC-FID results following the steps described in detail by Osorio et al. (2015). The EOs identification was performed by comparison with those available in the library NIST11 and by comparison of their Kováts retention index.

The base diet for the whole experimental period was a commercial feed (Trouw Nutrition<sup>®</sup>, Brazil) specific for omnivorous fish. The guaranteed levels of commercial feed used in the study were: 120 g kg<sup>-1</sup> moisture (max), 320 g kg<sup>-1</sup> crude protein (min), 45 g kg<sup>-1</sup> ether extract (min), 120 g kg<sup>-1</sup> mineral matter (max), 90 g kg<sup>-1</sup> fibrous matter (max), 10-35 g kg<sup>-1</sup> calcium (min-max), 6 g kg<sup>-1</sup> phosphorus (min), 1.5 g kg<sup>-1</sup> sodium



(min), 25 mg kg<sup>-1</sup> magnesium (min), 14.4 g kg<sup>-1</sup> lysine (min), 4.8 g kg<sup>-1</sup> methionine (min), 80 mg kg<sup>-1</sup> zinc (min), 20 mg kg<sup>-1</sup> copper (min), 35 mg kg<sup>-1</sup> iron (min), 50 mg kg<sup>-1</sup> manganese (min), 0.48 mg kg<sup>-1</sup> cobalt (min), 1 mg kg<sup>-1</sup> iodine (min), 0.2 mg kg<sup>-1</sup> selenium (min), 348 mg kg<sup>-1</sup> choline (min), 4.8 mg kg<sup>-1</sup> folic acid (min), 100 mg kg<sup>-1</sup> niacin (min), 0.5 mg kg<sup>-1</sup> biotin (min) and 32 mg kg<sup>-1</sup> pantothenic acid (min).

Each dose (100 mg kg<sup>-1</sup> and 250 mg kg<sup>-1</sup>) of EOs was weighed on a precision scale, mixed in soybean oil (4% of the diet) and spread in the base diet. The mixture in soybean oil was chosen since it is the practical applied substance used by fish farmers to administer dietary additives and antibiotics. The control group received the base diet with the addition of 4% soybean oil using the same method. The diets were prepared daily, and the fish were fed 3% of their body weight twice daily for 60 days.

#### *Blood parameters*

On days 7, 14, 30 and 60 after the beginning of feeding, three fish per tank (12 per treatment) were collected for the analysis of blood parameters. The fish were anesthetized with a benzocaine solution (100 mg L<sup>-1</sup>), and blood was collected from the caudal vessel using sterile syringes.

#### Hematological parameters

For the preparation of blood smears, a drop of whole blood from each sample was used. To count and differentiate leukocytes, the slides were stained using the Rosenfeld (1947) method. The total count provided data of leucocytes and thrombocytes by counting 2000 red blood cells. For the differential count, 200 white blood cells were counted (including lymphocytes, monocytes, neutrophils and eosinophils).

A portion of the blood was heparinized (5,000 U.I.) to perform the total count of red blood cells (RBCs) and for the analysis of the respiratory burst activity of leukocytes. For RBCs, each sample was stored in a formol citrate solution (1:200) using the method of Hesser (1960), and the values are expressed in  $10^6$  cells  $\text{mm}^{-3}$ .

The remaining blood (approximately 1.5 mL) was left to clot for 2 h at room temperature and centrifuged at 1,008g for 10 min (4 °C). Individual serum was used to conduct biochemical and immunological analyses.

#### Biochemical parameters

The values of serum total protein and albumin of the animals were assessed using Labtest<sup>®</sup> kits (references 99-250 and 19-1/250, respectively) and measured in a spectrophotometer (Unico 2100 Spectrophotometer) according to the manufacturer's instructions. The globulin data were calculated by subtracting the amount of albumin from the total protein. The results are expressed in  $\text{g dL}^{-1}$ .

The analyses of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were performed using Labtest<sup>®</sup> kits (references 108 and 109, respectively) in a UV/VIS spectrophotometer (Genesys 10S) according to the manufacturer's instructions, and the values are expressed in  $\text{UI L}^{-1}$ .

#### Immunological parameters

The respiratory burst activity of leukocytes was performed as described by Biller-Takahashi, Takahashi, Saita, Gimbo & Urbinati (2013), which is based on the reduction of nitroblue tetrazolium to formazan granules and was measured in a spectrophotometer (UNICO 2100 Spectrophotometer). The results are expressed as the optical density (OD).

Serum lysozyme concentrations were measured in an ELISA reader (Thermoplate reader MN) according to the methodology described by Ellis (1990) based on the lysis of *Micrococcus lysodeikticus*. The values are expressed in  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

The complement system (alternative pathway) activity (ACH50) of fish was estimated by the protocol described by Zanuzzo, Urbinati, Rise, Hall, Nash & Gamperl (2015), where each sample was measured as the time (minutes) required for the initial OD to be reduced by half (indicating 50% lysis of rabbit red blood cells by the activation of the complement system).

#### *Intestinal morphology*

Three fish from each tank (12 per treatment) were collected on days 7, 14, 30 and 60 to evaluate the intestinal morphology. After blood sampling, the animals were euthanized by deepening the anesthetic plan for the collection of the intestine. At necropsy, approximately 2 cm of the midgut was excised, opened with a longitudinal section and fixed in Bouin solution for 20 h. Subsequently, the material was maintained in 70% alcohol until histological processing. All samples were subjected to the conventional histological technique and embedded in paraffin. Histological slides were stained with periodic acid-Schiff (PAS).

Photomicrographs of the slides were processed under a NIKON E200<sup>®</sup> microscope (Nikon) equipped with Motic 2300 capture system (Motic) and measured using Image ProPlus<sup>®</sup> software (Media Cybernetics Inc.). Photomicrographs with a magnification of 100x were used to measure the length and thickness of the villi, while photomicrographs at a magnification of 400x were used for the quantification of goblet cells and intraepithelial lymphocytes (IELs) using a grid with a systematic set of

random windows of known area (Gundersen 1977). The data from cell counts were arranged by the number of cells per 100 enterocytes.

#### *Statistical analysis*

All values are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation and analyzed by SigmaStat (version 3.5) software (Systat Software). All parameters were analyzed using a one-way ANOVA. The significant results ( $p < 0.05$ ) from dependent variables were tested with the Tukey multicomparison test of means using a significance level of 0.05. Rare non-normal data were normalized using the square root transformation.

#### Results

##### *Essential oils*

Mentone (29.2%) and menthol (38.1%) were the major components of peppermint EO (Figure 1), while terpinen-4-ol (46.8%) and  $\gamma$ -terpinene (15.3%) were the major components of the EO of tea tree (Figure 2).

##### *Hematological parameters*

The inclusion of peppermint and tea tree at concentrations of 100 and 250 mg  $\text{kg}^{-1}$  did not affect the hematological parameters of Nile tilapia, which were statistically similar ( $p > 0.05$ ) to the control until day 60 after the beginning of the feeding (Tables 2, 3 and 4). The RBCs on day 14 were lost, making it impossible to calculate some hematological parameters in this sample.

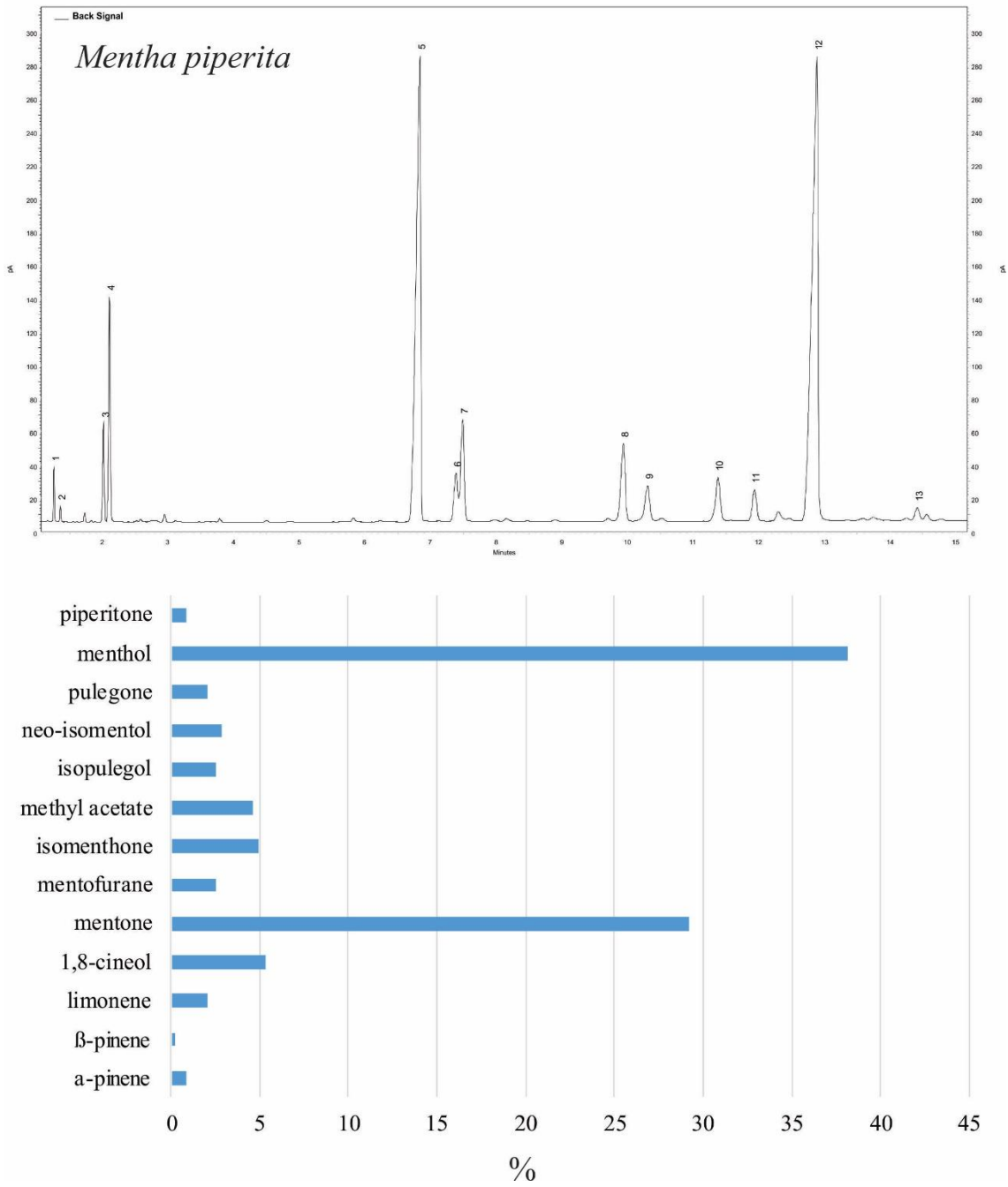


Fig. 1. Chromatogram and chemical constituents of the essential oil of peppermint (*Mentha piperita*).

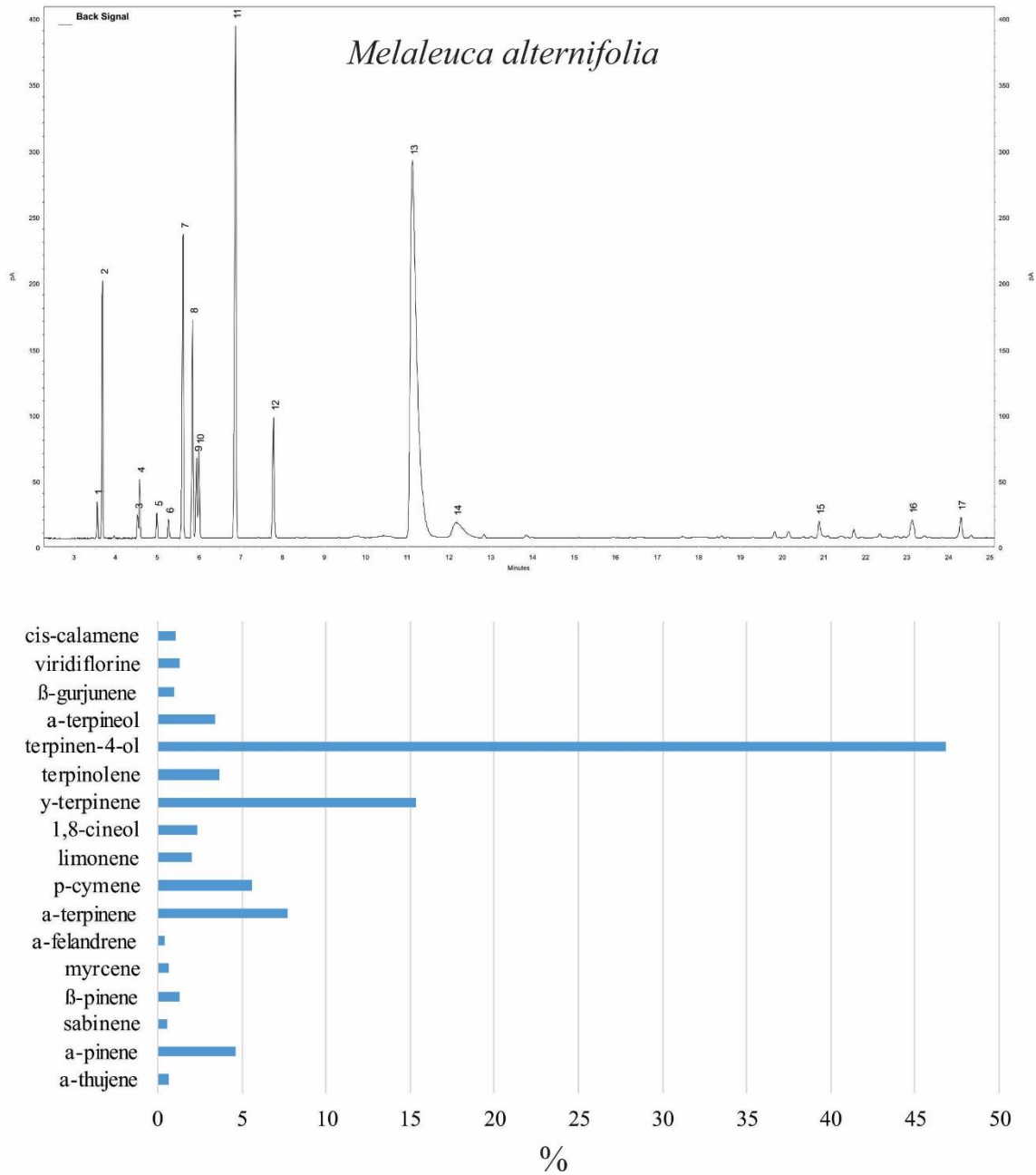


Fig. 2. Chromatogram and chemical constituents of the essential oil of tea tree (*Melaleuca alternifolia*).

Table 2. Hematological parameters of fish in the control group and the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*) after 7 days of feeding.

Blood cells	Day 7					P value
	Control	Peppermint		Tea tree		
		100 mg kg <sup>-1</sup>	250 mg kg <sup>-1</sup>	100 mg kg <sup>-1</sup>	250 mg kg <sup>-1</sup>	
Erythrocytes (x10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	1.48 ± 0.31	1.68 ± 0.23	1.66 ± 0.47	1.38 ± 0.15	1.45 ± 0.24	0.553
Thrombocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	14.37 ± 8.92	17.5 ± 6.83	18.26 ± 7.8	11.64 ± 5.56	10.58 ± 2.51	0.419
Leukocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	24.19 ± 10.44	27.25 ± 7.2	32.25 ± 16.04	21.0 ± 6.32	21.02 ± 6.69	0.491
Lymphocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	20.9 ± 10.54	25.24 ± 6.83	30.47 ± 16.13	18.60 ± 6.18	18.68 ± 6.5	0.422
Monocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	2.01 ± 0.22	1.35 ± 0.3	1.23 ± 0.46	1.75 ± 0.35	1.48 ± 0.51	0.070
Neutrophils (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	1.22 ± 0.43	0.73 ± 0.25	0.74 ± 0.08	0.83 ± 0.3	0.81 ± 0.54	0.444
Basophils (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	0.03 ± 0.07	0.03 ± 0.04	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.790
Eosinophils (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	0.05 ± 0.07	0.02 ± 0.04	0.05 ± 0.06	0.05 ± 0.03	0.02 ± 0.03	0.813

Table 3. Hematological parameters of fish in the control group and the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*) after 30 days of feeding.

Blood cells	Day 30					P value
	Control	Peppermint		Tea tree		
		100 mg kg <sup>-1</sup>	250 mg kg <sup>-1</sup>	100 mg kg <sup>-1</sup>	250 mg kg <sup>-1</sup>	
Erythrocytes (x10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	1.65 ± 0.14	1.39 ± 0.13	1.74 ± 0.29	1.72 ± 0.23	1.87 ± 0.29	0.089
Thrombocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	26.57 ± 4.32	19.05 ± 2.71	20.08 ± 6.05	29.30 ± 9.85	23.75 ± 6.94	0.184
Leukocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	43.54 ± 9.36	39.67 ± 16.65	38.35 ± 4.88	50.46 ± 5.25	58.19 ± 15.70	0.129
Lymphocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	39.20 ± 7.90	33.39 ± 18.38	33.95 ± 4.79	42.04 ± 7.08	50.67 ± 12.26	0.203
Monocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	1.96 ± 0.52ab	1.24 ± 0.37b	2.62 ± 1.19ab	2.91 ± 1.54ab	3.80 ± 1.30a	0.045
Neutrophils (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	2.20 ± 1.22	1.38 ± 0.24	1.76 ± 0.77	3.26 ± 1.05	5.04 ± 3.43	0.059
Basophils (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	0.08 ± 0.11	0.09 ± 0.14	0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.07	0.675
Eosinophils (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	0.10 ± 0.19	0.02 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.16 ± 0.15	0.02 ± 0.04	0.286

\* Different letters indicate significant differences between the means of the treatments.



Table 4. Hematological parameters of fish in the control group and the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*) after 60 days of feeding.

Blood cells	Day 60					P value
	Control	Peppermint		Tea tree		
		100 mg kg <sup>-1</sup>	250 mg kg <sup>-1</sup>	100 mg kg <sup>-1</sup>	250 mg kg <sup>-1</sup>	
Erythrocytes (x10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	2.02 ± 0.06	1.96 ± 0.22	1.86 ± 0.19	2.11 ± 0.23	1.93 ± 0.15	0.565
Thrombocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	34.47 ± 3.6	36.77 ± 6.74	31.77 ± 3.8	38.32 ± 9.73	33.49 ± 7.13	0.778
Leukocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	83.1 ± 14	85.97 ± 10.87	69.33 ± 7.29	82.34 ± 17.69	86.89 ± 2.25	0.370
Lymphocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	72.52 ± 15.53	78.3 ± 13.79	56.92 ± 13.02	69.55 ± 7.89	71.7 ± 7.91	0.413
Monocytes (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	7.7 ± 4.31	4.55 ± 1.77	6.21 ± 5.2	9.28 ± 8.58	6.96 ± 2.5	0.880
Neutrophils (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	6.1 ± 2.65	2.85 ± 1.02	3.66 ± 1.76	4.86 ± 3.5	7.87 ± 3.7	0.322
Basophils (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	0.1 ± 0.08	0.1 ± 0.03	0 ± 0	0.07 ± 0.04	0.13 ± 0.02	0.07
Eosinophils (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	0.14 ± 0.13	0.09 ± 0.05	0.1 ± 0.17	0.11 ± 0.15	0.24 ± 0.08	0.615

### *Biochemical parameters*

The total protein, albumin and globulin parameters were not altered with the use of the EOs compared to the control ( $p>0.05$ ) (Figure 3). Liver enzymes ALT and AST were not altered with the use of EOs compared to the control ( $p>0.05$ ), indicating that the fish did not suffer liver damage when receiving the supplemented diets (Figure 3).

### *Immunological parameters*

The lysozyme and the burst activities did not change with the use of tea tree or peppermint compared to the control (Figure 4). The ACH50, however, was enhanced in the groups that received  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  peppermint and  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  tea tree compared to control after 60 days of feeding since the time (in minutes) to cause 50% hemolysis of rabbit blood cells was significantly lower ( $p<0.05$ ) (Figure 4).

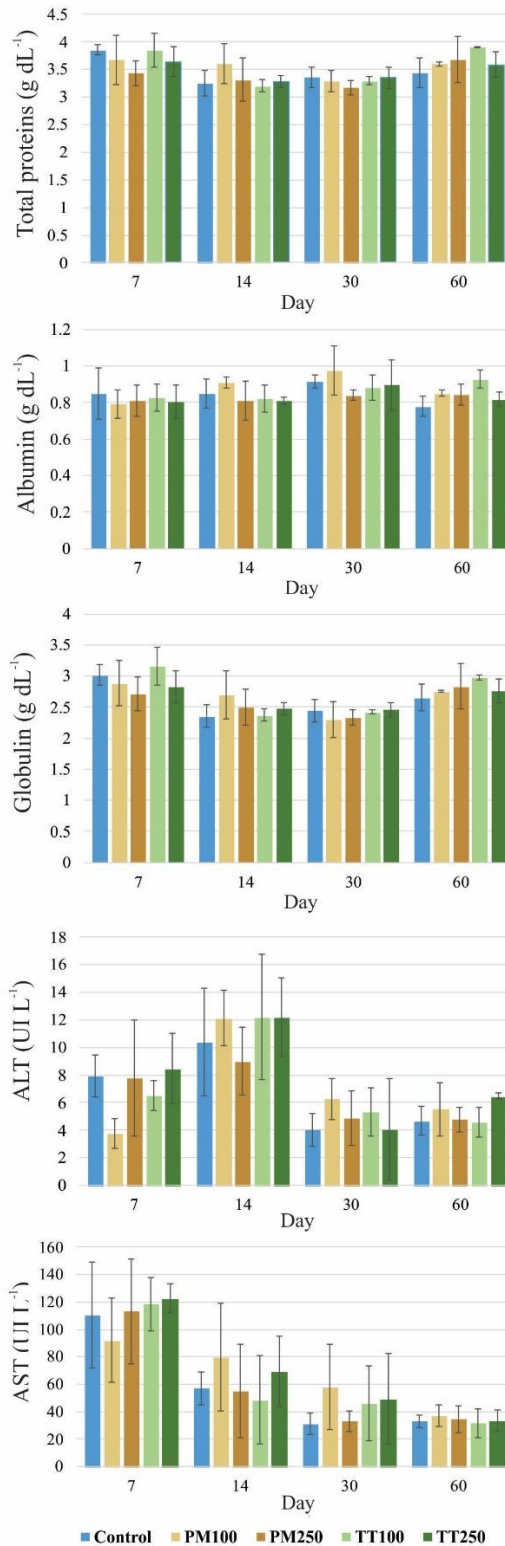


Fig. 3. Biochemical parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed with a control diet, 100 mg kg<sup>-1</sup> peppermint (*Mentha piperita*) (PM100), 250 mg kg<sup>-1</sup> peppermint (*Mentha piperita*) (PM250), 100 mg kg<sup>-1</sup> tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (TT100) and 250 mg kg<sup>-1</sup> tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (TT250).

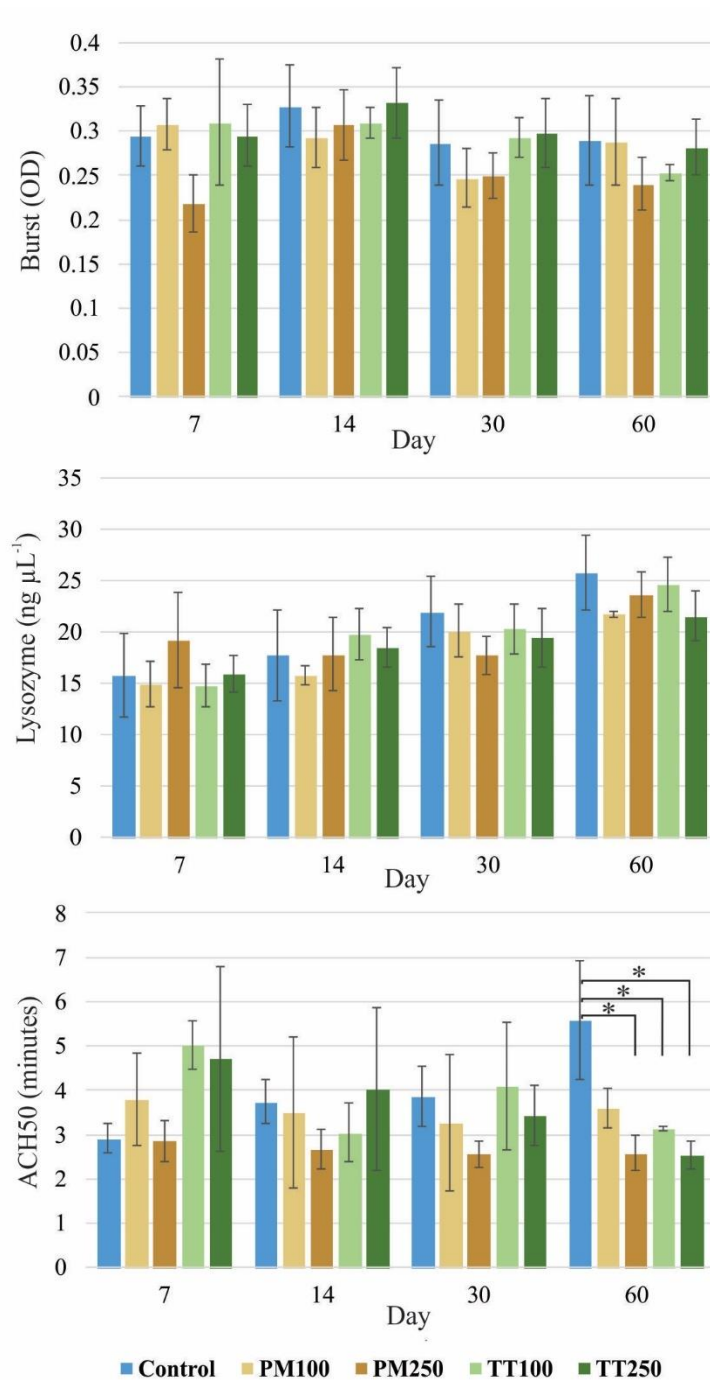


Fig. 4. Immunological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed with a control diet, 100 mg kg<sup>-1</sup> peppermint (*Mentha piperita*) (PM100), 250 mg kg<sup>-1</sup> peppermint (*Mentha piperita*) (PM250), 100 mg kg<sup>-1</sup> tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (TT100) and 250 mg kg<sup>-1</sup> tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (TT250).

### *Intestinal morphology*

Regarding the intestinal measurements, the length of villi was not altered using EOs for up to 30 days of feeding ( $p>0.05$ ). However, after 60 days of feeding, fish fed a diet containing tea tree ( $250 \text{ mg kg}^{-1}$ ) had significantly higher villi length compared to the other groups ( $p<0.05$ ) (Table 5). Figure 5 illustrates the difference in villi length of the fish in the control group and in the group fed with  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  tea tree.

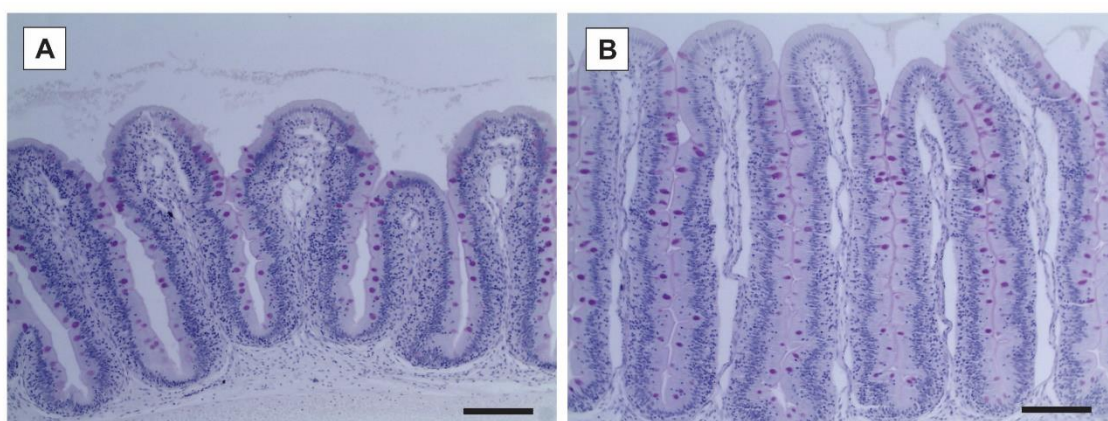


Fig. 5. Visual comparison between the intestinal villi of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, of the control group (a) and the group fed with  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (b). Scale bars:  $100 \mu\text{m}$ .

Regarding the quantification of intestinal cells, the number of goblet cells was not altered with supplementation of up to  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  tea tree and peppermint for up to 60 days ( $p>0.05$ ) (Table 6). Fish fed diets containing higher levels ( $250 \text{ mg kg}^{-1}$ ) of both herbal medicines tended to have an increased number of IELs on days 14 and 60 (Table 6). However, the two inclusion levels were not sufficient to observe a significant difference ( $p>0.05$ ) in this parameter (Table 6).

Table 5. Measurement of intestinal parameters of fish of the control group and of the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*) EOs.

Villi measures ( $\mu\text{m}$ )	Day	Control	Peppermint		Tea tree		P value
			100 mg kg <sup>-1</sup>	250 mg kg <sup>-1</sup>	100 mg kg <sup>-1</sup>	250 mg kg <sup>-1</sup>	
Length	7	309.99 $\pm$ 51.78	340.60 $\pm$ 27.11	302.98 $\pm$ 57.17	333.35 $\pm$ 14.69	308.06 $\pm$ 19.77	0.558
	14	378.07 $\pm$ 24.44	383.13 $\pm$ 16.89	383.28 $\pm$ 22.01	363.13 $\pm$ 43.80	398.76 $\pm$ 45.73	0.664
	30	321.13 $\pm$ 68.50	418.11 $\pm$ 45.52	398.72 $\pm$ 92.26	384.04 $\pm$ 65.42	400.07 $\pm$ 27.76	0.289
	60	421.35 $\pm$ 23.32b	446.40 $\pm$ 60.87b	401.79 $\pm$ 28.97b	459.79 $\pm$ 52.72b	540.52 $\pm$ 22.35a	0.020
Thickness	7	136.51 $\pm$ 14.44	138.20 $\pm$ 12.76	152.69 $\pm$ 5.69	146.48 $\pm$ 5.34	138.60 $\pm$ 8.21	0.164
	14	139.82 $\pm$ 4.06	138.33 $\pm$ 9.80	151.34 $\pm$ 8.92	147.75 $\pm$ 11.04	145.30 $\pm$ 6.65	0.214
	30	120.06 $\pm$ 16.96	156.82 $\pm$ 26.95	144.77 $\pm$ 26.25	131.04 $\pm$ 14.12	144.17 $\pm$ 13.17	0.159
	60	150.29 $\pm$ 8.04	163.81 $\pm$ 6.78	157.73 $\pm$ 13.12	158.29 $\pm$ 14.76	157.73 $\pm$ 3.12	0.586

\* Different letters indicate significant differences between the means of the treatments.

Table 6. Quantification of intestinal cells of fish of the control group and of the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*) EOs.

Intestinal cells (per 100 enterocytes)	Day	Control	Peppermint		Tea tree		P value
			100 mg kg <sup>-1</sup>	250 mg kg <sup>-1</sup>	100 mg kg <sup>-1</sup>	250 mg kg <sup>-1</sup>	
Goblet cells	7	5.10 ± 2.09	5.27 ± 3.04	5.26 ± 0.31	6.51 ± 1.94	5.88 ± 2.29	0.895
	14	5.22 ± 0.99	4.01 ± 1.66	3.90 ± 1.40	4.63 ± 0.69	6.75 ± 1.76	0.060
	30	7.92 ± 0.67	8.85 ± 3.80	8.31 ± 2.61	8.83 ± 1.94	8.56 ± 2.85	0.986
	60	8.58 ± 2.48	7.21 ± 1.14	9.21 ± 1.10	8.58 ± 1.19	10.81 ± 3.39	0.252
Intraepithelial lymphocytes	7	53.14 ± 7.08	54.09 ± 7.45	61.45 ± 6.26	50.78 ± 15.55	50.90 ± 14.73	0.648
	14	46.74 ± 4.05	46.20 ± 6.86	58.54 ± 4.02	50.36 ± 8.23	56.10 ± 2.88	0.051
	30	62.60 ± 1.43	53.01 ± 12.48	53.89 ± 12.87	50.76 ± 16.36	57.75 ± 9.28	0.643
	60	37.21 ± 6.59	37.28 ± 1.60	56.68 ± 12.89	55.85 ± 18.01	50.50 ± 9.42	0.09

## Discussion

All diets containing the EOs were considered safe for the fish in this study because the animals were fed normally, showed no behavioral changes and did not undergo negative hematological alterations, and the result of the ALT and AST enzyme tests indicated no liver damage. Furthermore, this study revealed that EOs had beneficial effects on the complement system and on intestinal morphology.

According to different review articles (Galina et al., 2009; Citarasu 2010; Chakraborty & Hancz, 2011; Harikrishnan et al., 2011; Reverter et al., 2014), some authors have highlighted the beneficial effects of different herbal medicines (extracts and powder) on fish blood cells; however, there are few studies that show that EOs also beneficially affect these parameters. The use of peppermint and tea tree EOs (100 and 250 mg kg<sup>-1</sup>) did not alter the hematological parameters of Nile tilapia in this study, and a similar result was found by Saccol, Uczay, Pês, Finamor, Ourique, Riffel, Schmidt, Caron, Heinzmann, Llesuy, Lazzari, Baldisserotto & Pavanato (2013), who fed silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), with 0.25 to 2 mL kg<sup>-1</sup> *Lippia alba* EO for 60 days. EO studies have increased in recent years, and recently, it is understood that supplementation with EOs only at concentrations above 1 g kg<sup>-1</sup> for approximately 60 days cause changes in the hematological parameters of tilapia (Acar, Kesbiç, Yılmaz, Gültepe & Türker 2015; Baba, Acar, Öntaş, Kesbiç & Yılmaz 2016; Brum, Pereira, Owatari, Chagas, Chaves, Mouriño & Martins 2017). Based on these recent results, it appears that there is a need for large amounts of EOs in the feed to result in an effect on the blood cells of fish. For the serum biochemical parameters (total proteins and albumin), it is partially the same. The total amount of protein increased, but albumin was not altered even with high doses of EOs (Acar et al., 2015; Baba et al., 2016). Under the conditions tested here, these parameters were not changed.



Regarding the immunological parameters evaluated, the activity of the complement system was increased with the use of peppermint and tea tree EOs. The complement system is essential for the innate immune system of the fish and is most well-known for its capacity to kill pathogens by creating pores in their surface membranes or by opsonizing pathogens by stimulating phagocytosis (Holland & Lambris 2002). In addition, complement system activation contributes significantly to fish immunity by enhancing the adaptive immune response (Holland & Lambris 2002; Boshra, Li & Sunyer 2006). The rapid activation of the complement system in fish fed for 60 days with peppermint and tea tree EOs reveals that these herbal medicines have great potential to be used as an immunostimulant for fish. Knowing the role of the complement system in animal health, fish fed diets containing these herbal products may present better responses to the natural exposures to pathogens in the culture environment or present better responses to immunization with vaccines. These are some characteristics that deserve to be evaluated and validated under field conditions.

The use of these EOs also positively influences features of gut morphology. It is known that the intestine plays an important role in the productivity of animals because it acts directly on the digestion and assimilation of nutrients, but it also has a relevant function in the immune system, as described by Nicholson, Holmes, Kinross, Burcelin, Gibson, Jia & Pettersson (2012). Many infectious diseases are initiated by colonization of the intestinal mucosa, and the efficiency of the intestinal barrier depends on the production of mucus and epithelial integrity to prevent the onset of disease. The increase in the length of the villi of fish fed with EOs reveals another benefit of using these molecules as a supplement for fish feeding because long villi are usually equated with excellent gut health, high absorption efficiency and healthier intestinal tracts of animals (Mohamed, El-Daly, El-Azeem, Youssef & Hassan 2014).

It is possible to conclude that both peppermint and tea tree EOs have potential for use as an additive in fish feed, showing benefits in intestinal health and on immune parameters, even at low doses of supplementation, which can guarantee inclusion in the diet at a low cost. Based on these results, other secondary benefits, such as improved feed conversion, increased weight gain, and increased resistance to environmental stress, parasites and bacteria, should be evaluated under culture conditions to evaluate the cost and benefit of using these molecules.

#### Acknowledgements

Thanks to the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (140487/2014-0) and the São Paulo Research Foundation – FAPESP (2014/14039-9) for granting the scholarship. Thanks also to Dra. Vany P. Ferraz (Chromatography Laboratory, Department of Chemistry, UFMG) for assistance with the analysis of the essential oils.

#### References

- Acar Ü., Kesbiç O.S., Yılmaz S., 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., Amiri A.A., Zorriehzahra J., Nematolahi A. & Esteban M.Á. (2015) Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish & Shellfish Immunology* 45(2), 841-847.

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 Immunology* 55, 267-273.

Baba E., Acar Ü., Öntaş C., Kesbiç O.S. & 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.

Biller-Takahashi J.D., Takahashi L.S., Saita M.V., Gimbo R.Y., Urbinati E.C. (2013) Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology* 73(2), 425-429.

Boshra H., Li J. & Sunyer J.O. (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* 20(2), 239-262.

Brum A., Pereira S.A., Owatari M.S., Chagas E.C., Chaves F.C.M., Mouriño J.L.P. & Martins M.L. (2017) Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 468, 235-243.

Chakraborty S.B. & Hancz C. (2011) Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture* 3(3), 103-119.

Citarasu T. (2010) Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International* 18(3), 403-414.

Costa J.C., Valladão G.M.R., Pala G., Gallani S.U., Kotzent S., Crotti A.E.M., Fracarolli L., Silva J.J.M & Pilarski, F. (2017) *Copaifera duckei* oleoresin as a novel

alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture* 471, 72-79.

Ellis A.E. (1990) Lysozyme Assays. In: *Techniques In Fish Immunology* (ed. by: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, Muiswinkel WB), 220. Sos Publications, California.

Encarnação P. (2015) Functional feed additives in aquaculture feeds. *Aquafeed Formulation*, 217.

Galina J., Yin G., Ardo L. & Jeney Z. (2009) The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry* 35(4), 669-676.

Gundersen H.J.G. (1977) Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *Journal of Microscopy* 111(2), 219-223.

Harikrishnan R., Balasundaram C. & Heo M.S. (2011) Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317(1), 1-15.

Hashimoto G.S.O., Neto F.M., Ruiz M.L., Acchile M., Chagas E.C., Chaves F.C.M. & Martins M.L. (2016) Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture* 450, 182-186.

Hesser E.F. (1960) Methods for routine on fish hematology. *The Progressive Fish Culturist* 22, 164-171.

Holland M.C.H. & Lambris J.D. (2002) The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology* 12(5), 399-420.

Malheiros D.F., Maciel P.O., Videira M.N. & Tavares-Dias M. (2016) Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture* 455, 81-86.

McKay D.L. & Blumberg J.B. (2006) A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research* 20(8), 619-633.

Mohamed M.A., El-Daly E.F., El-Azeem N.A.A., Youssef A.W. & Hassan H.M.A. (2014) Growth performance and histological changes in ileum and immune related organs of broilers fed organic acids or antibiotic growth promoter. *International Journal of Poultry Science* 13(10), 602-610.

Ngamkala S., Futami K., Endo M., Maita M. & Katagiri T. (2010) Immunological effects of glucan and *Lactobacillus rhamnosus* GG, a probiotic bacterium, on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* intestine with oral *Aeromonas* challenges. *Fisheries Science* 76(5), 833-840.

Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J., Burcelin R., Gibson G., Jia W. & Pettersson S. (2012) Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336(6086), 1262-1267.

Osorio, A., Silva, T. M., Duarte, L. P., Ferraz, V. P., Pereira, M. T., Mercadante-Simões, M. O., Evangelista, F. C. G., Sabino, A. P., & Alcântara, A. F. (2015) Essential oil from flowers of *Solanum stipulaceum*: Composition, effects of  $\gamma$ -radiation, and antileukemic activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 26(11), 2233-2240.

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.

Ribeiro S.C., Castelo A.S., Silva B.M.P.D., Cunha A.D.S., Proietti-Junior A.A. & Oba-Yoshioka E.T. (2016) Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Acta Amazonica* 46(1), 99-106.

Rico A. & Van den Brink P.J. (2014) Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. *Science of the Total Environment* 468, 630-641.

Rosenfeld G. (1947) Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan* 20, 329-334.

Saccol E.M., Uczay J., Pês T.S., Finamor I.A., Ourique G.M., Riffel A.P., Schmidt D., Caron B.O., Heinzmann BM, Llesuy S.F., Lazzari R., Baldisserotto B., Pavanato M.A. (2013) Addition of *Lippia alba* (Mill) NE Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. *Aquaculture* 416, 244-254.

Steverding D., Morgan E., Tkaczynski P., Walder F. & Tinsley R. (2005) Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp. infection of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 66(1), 29-32.

Talpur A.D. (2014) *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* 420, 71-78.

Thomsen P.S., Jensen T.M., Hammer K.A., Carson C.F., Mølgaard P. & Riley T.V. (2011) Survey of the antimicrobial activity of commercially available Australian

tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil products in vitro. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 17(9), 835-841.

Valladão G.M.R., Gallani S.U., Ikefuti C.V., Cruz C., Levy-Pereira N., Rodrigues M.V.N. & Pilarski F. (2016) Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Fish Diseases* 39(10), 1143-1152.

Welker T.L., Lim C., Yildirim-Aksoy M. & Klesius P.H. (2012) Use of Diet Crossover to Determine the Effects of beta-glucan Supplementation on Immunity and Growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of The World Aquaculture Society* 76(5), 833-840.

Zanuzzo F.S., Urbinati E.C., Rise M.L., Hall J.R., Nash G.W., Gamperl A.K. (2015) *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in *Aloe vera* fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture* 435, 1-9.

### Capítulo 3 - Resultados apresentados em congresso na forma de pôster.

Efeito *in vitro* de óleos essenciais sobre isolados intestinais de tilápia-do-Nilo

*Oreochromis niloticus*

#### Resumo

A fim de avaliar a atividade contra isolados bacterianos intestinais, os óleos essenciais (OE) de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita*, usados no capítulo 2 da presente tese, foram comparados com outros quatro OEs (*Citrus aurantium*, *Cymbopogon nardus*, *Ocimum basilicum* e *Thymus vulgaris*). Testes *in vitro* (concentração inibitória mínima - CIM e concentração bactericida mínima - CBM) contra isolados intestinais da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* foram realizados. Os isolados mais abundantes foram purificados e identificados por PCR (reação em cadeia da polimerase) das colônias. As bactérias gram negativas *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda*, e a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* foram identificadas e utilizadas nos testes de CIM e CBM. Todos os OEs foram analisados para identificação e descrição de seus componentes. Baseado nos resultados do teste *in vitro*, os OEs de *M. alternifolia* e *M. piperita*, *C. aurantium*, *C. nardus* e *O. basilicum* apresentam baixa atividade contra as bactérias intestinais testadas, enquanto que, o OE de tomilho apresentou uma forte atividade. Com base no resultado deste estudo e nas informações da literatura, nós indicamos que este OE apresenta maior potencial de modular a microbiota do peixe quando adicionado à dieta comparado aos outros testados. Desta forma, propusemos um terceiro estudo avaliando o seu efeito *in vivo*.

Palavras-chave: fitoterápicos, aquicultura, antimicrobiano, tomilho.



## Introdução

O trato intestinal dos peixes é composto por uma complexa microbiota que pode ser modificada de acordo com a dieta fornecida e com o ambiente (Nayak, 2010). Conhecer o efeito de moléculas antimicrobianas sobre as diferentes populações de microrganismos presentes no intestino pode ajudar na formulação de produtos moduladores da microbiota. Existem alguns exemplos na literatura que mostraram que os OEs podem apresentar este efeito, inibindo a proliferação de *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* em aves (Cho et al., 2014), diminuindo bactérias patogênicas (*Salmonella enterica* e *E. coli*) e aumentando bactérias benéficas (*Lactobacillus* spp.) em suínos (Ahmed et al., 2013), além de diminuir as bactérias *E. coli* e *Aeromonas* spp. no intestino de peixes (Al-Sagheer et al., 2017).

Existem incontáveis moléculas naturais e sintéticas com potencial antimicrobiano, por isso estudos *in vitro* (“screening”) são necessários para evitar a realização de testes desnecessários *in vivo*. Assim sendo, os testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) são comumente empregados (Balouiri et al., 2016). Dados descritos na literatura demonstraram que alguns pesquisadores já avaliaram *in vitro* o uso de antimicrobianos (Yáñez et al., 2014; Chang et al., 2016) e de extratos de plantas medicinais (Muniruzzaman & Chowdhury, 2004; Michel et al., 2005; Bulfon et al., 2014) contra isolados patogênicos de peixes. Apesar disso, testes *in vitro* com isolados bacterianos do intestino de tilápia e com os OEs do presente estudo foram realizados, pois ambos podem apresentar diferenças daqueles já publicados. Os isolados, mesmo que da mesma espécie bacteriana, podem apresentar diferenças na sua sensibilidade às moléculas devido ao ambiente e ao seu hospedeiro. Assim como, o OE de uma mesma planta já estudada pode apresentar

diferentes atividades daquelas já publicadas dependendo da forma que foi produzido, obtido e processado.

## Material e métodos

### *Isolamento de bactérias intestinais*

O conteúdo intestinal de tilápias foi coletado assepticamente, diluído em concentrações seriadas e plaqueado em Agar Triptona de Soja (TSA) à 29°C por 24 h. As colônias mais abundantes foram repicadas e purificadas para sua identificação.

Para a identificação dos isolados, extração de DNA e PCR (reação em cadeia da polimerase) de cada colônia seguida por sequenciamento do gene 16S rRNA usando os iniciadores 8F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') e 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') foram realizadas seguindo o método descrito por Sebastião et al. (2015). A identificação das sequências foi realizada utilizando a ferramenta de pesquisa (BLAST) do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).

### *Óleos essenciais (OEs)*

Os OEs de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* foram comparados com mais quatro OEs (*Citrus aurantium*, *Cymbopogon nardus*, *Ocimum basilicum* e *Thymus vulgaris*). Todos foram adquiridos da empresa Phytoterapica® e testados contra os três isolados selecionados no estudo.

Amostras dos OEs foram analisadas por cromatografia gasosa (CG) com detector de ionização de chama (FID) usando um sistema Agilent HP 7820A. Em detalhes, as separações foram realizadas em colunas HP-5 capilares de sílica fundida Agilent (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm). A temperatura do CG foi a seguinte: um inicial de

50°C inicial até 200°C aumentando a temperatura em 3°C por minuto. A temperatura do injector (“split” 1/50) foi de 200°C, o volume de injeção 1 µL e a temperatura do detector FID de 220°C. Os compostos foram analisados usando o software EZChrom Elite Compact e os constituintes foram identificados através do índice de retenção linear baseado no método de Kováts. A fim de confirmação dos resultados obtidos, CG acoplada a espectrometria de massa (MS) foram realizadas seguindo as etapas descritas em detalhes por Osorio et al. (2015). A identificação dos OEs foi realizada em comparação com aqueles disponíveis na biblioteca NIST11.

*Teste in vitro de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)*

Neste estudo, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais para as bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* e *Edwardsiella tarda*. As bactérias, identificadas por sequenciamento do gene 16rRNA, foram ativadas em ágar Mueller-Hinton (29°C por 24 horas). As colônias foram adicionadas em meio líquido Muller-Hinton até atingir a concentração inicial teste de 10<sup>8</sup> UFC/mL em leitura no espectrofotômetro (valores entre 0,08 e 0,130 em 625 nm).

O teste *in vitro* foi realizado seguindo a metodologia descrita em revisão de Balouiri et al. (2016). Detalhadamente, 150 µL de meio líquido (Muller-Hinton) foi adicionado em poços de uma placa de microtitulação (96 poços). Em seguida, foi feita adição de 150 µL das soluções com OE (400 µL do OE solubilizado em 800 µL de dimetilsulfóxido, adicionado em 7,6 mL de meio líquido) em triplicata na primeira fileira de poços (concentração mais alta). A partir da primeira fileira de poços, foi realizada a diluição seriada para o teste de oito concentrações de cada OE.

Posteriormente, 50 µL da solução bacteriana foi adicionada em cada poço. As concentrações finais de teste dos OEs foram de 3,0; 1,5; 0,75; 0,375; 0,188; 0,094; 0,047 e 0,023 (% v/v), enquanto que a concentração final de bactéria foi ajustada para  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

O teste foi realizado com três grupos controles: apenas meio líquido, meio líquido com OE e meio líquido com bactéria. Após 24 h de crescimento em 29°C, o corante cloreto de trifeniltetrazólio foi adicionado para auxiliar na avaliação macroscópica do crescimento bacteriano nos poços.

Os valores de CIM foram determinados pela primeira concentração que não foi corada em rosa após a adição do corante. Os valores de CBM foram determinados plaqueando os poços não corados (onde não houve crescimento bacteriano) em ágar Muller-Hinton. A CBM foi considerada sendo a maior concentração onde não houve crescimento bacteriano na placa após 24 h de cultivo.

Os dados foram interpretados baseados na classificação proposta por Aligiannis et al. (2001) e utilizada por Oliveira et al. (2006), em que a atividade antimicrobiana dos OEs é considerada forte para valores de MIC até 0,5 ml/mL (0,05% v/v), moderada para valores de MIC entre 0,5-1,5 ml/mL (0,05-0,15% v/v) e fraca para valores acima de 1,5 ml/mL (0,15% v/v).

## Resultados

### *Isolamento de bactérias intestinais*

Três bactérias isoladas, sendo duas gram negativas (*Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda*) e uma gram positiva (*Staphylococcus aureus*) foram selecionadas para realização do teste *in vitro* comparando os seis óleos essenciais.

Ambas gram negativas foram selecionadas devido sua importância na aquicultura, já que são conhecidamente responsáveis por causar doenças nos peixes, enquanto que a bactéria *S. aureus* foi selecionada para ser uma representante das bactérias gram positivas, por ter sido uma das mais abundantes no isolamento e por ser de fácil cultivo durante os testes.

#### *Óleos essenciais (OEs)*

O limoneno (93,7%) foi o principal componente do OE de *C. aurantium*. O citronelal (44,1%), geraniol (13,7%) e o citronelol (10,1%) foram os principais componentes do OE de *C. nardus*. A mentona (29,2%) e o mentol (38,1%) foram os componentes majoritários do OE de *M. piperita*. O terpinen-4-ol (46,8%) e o  $\gamma$ -terpineno (15,3%) foram os componentes majoritários do OE de *M. alternifolia*. O estragol (69,7%) e o linalool (22,3%) foram os principais componentes do OE de *O. basilicum*. O timol (41,6%) e o o-cimeno (31,3%) foram os principais componentes do OE de *T. vulgaris* (Tabela 1).

#### *Teste in vitro de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)*

Ambos OEs previamente estudados (*M. alternifolia* e *M. piperita*) foram comparados com outros quatro OEs (*C. aurantium*, *C. nardus*, *O. basilicum* e *T. vulgaris*).

Os OEs de *C. aurantium*, *M. piperita* e *M. alternifolia* apresentaram CIM e CBM igual ou maior que 0,75% para os três isolados. O OE de *O. basilicum* apresentou CIM de 0,75% para *A. hydrophila*, 0,187% para *E. tarda* e 3% para *S. aureus*. O OE de *C. nardus* apresentou CIM de 0,187% para *A. hydrophila*, 0,093 para *E. tarda* e 0,375%

para *S. aureus*. Por outro lado, o OE de *T. vulgaris* apresentou CIM e CBM menor que 0,023% para todos os isolados, com destaque para a forte atividade também contra a bactéria gram positiva (*S. aureus*) quando comparado aos outros OEs (Tabela 2).

Tabela 1. Análise química dos óleos essenciais utilizados no estudo *in vitro*.

<i>Citrus aurantium</i>		<i>Cymbopogon nardus</i>		<i>Melaleuca alternifolia</i>		<i>Mentha piperita</i>		<i>Ocimum basilicum</i>		<i>Thymus vulgaris</i>	
Constituintes (%)		Constituintes (%)		Constituintes (%)		Constituintes (%)		Constituintes (%)		Constituintes (%)	
$\alpha$ -pineno	0.6	$\alpha$ -felandreno	0.6	$\alpha$ -thujeno	0.6	$\alpha$ -pineno	0.8	$\alpha$ -pineno	0.2	$\alpha$ -pineno	2.5
sabineno	0.6	limoneno	3.4	$\alpha$ -pineno	4.6	$\beta$ -pineno	0.2	mirceno	0.1	mirceno	0.6
mirceno	1.8	E- $\beta$ -ocimeno	0.6	sabineno	0.5	limoneno	2	limoneno	0.2	$\alpha$ -terpineno	0.9
$\alpha$ -felandreno	0.5	$\gamma$ -terpineno	0.5	$\beta$ -pineno	1.3	1,8-cineol	5.3	1,8-cineol	0.4	o-cimeno	31.3
limoneno	93.7	linalool	2.3	mirceno	0.6	mentona	29.2	t-ocimeno	0.1	limoneno	2.2
terpinoleno	0.1	citronelal	44.1	$\alpha$ -felandreno	0.4	mentofurano	2.5	mentenol	0.3	1,8-cineol	0.9
linalool	1	terpinen-4ol	0.7	$\alpha$ -terpineno	7.7	isomentona	4.9	terpinoleno	0.3	$\gamma$ -terpineno	0.3
Z-oxido limoneno	0.3	mirtenol	1.2	p-cimeno	5.6	acetato mentila	4.6	linalool	22.3	terpinoleno	0.4
E-oxido limoneno	0.2	citronelol	10.1	limoneno	2	isopulegol	2.5	canfora	0.1	linalool	7
$\alpha$ -terpineol	0.5	geraniol	13.7	1,8-cineol	2.3	neo-isomentol	2.8	estragol	69.7	isoborneol	1.2
neral	0.3	acetato citronelila	2.6	$\gamma$ -terpineno	15.3	pulegona	2	acetato fenchila	0.4	timol metil eter	0.3
		acetato geranila	8.1	terpinoleno	3.6	mentol	38.1	acetato bornila	0.6	dehidrocarvona	0.6
		$\beta$ -elemeno	4	terpinen-4-ol	46.8	piperitona	0.8	$\beta$ -cariofileno	0.6	timol	41.6
				$\alpha$ -terpineol	3.4			$\delta$ -cadineo	1	carvacrol	8.7
				$\beta$ -gurjuneno	0.9			oxido cariofileno	0.6	$\beta$ -cariofileno	0.8
				viridiflorino	1.3						
				cis-calameno	1						

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais contra isolados intestinais.

Óleo essencial	<i>Aeromonas hydrophila</i>			<i>Edwardsiella tarda</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	CIM (%)	CBM (%)	CBM/CIM	CIM (%)	CBM (%)	CBM/CIM	CIM (%)	CBM (%)	CBM/CIM
<i>Citrus aurantium</i>	1,5	1,5	1	1,5	3	2	3	3	1
<i>Cymbopogon nardus</i>	0,187	0,75	4	0,093	0,187	2	0,375	0,375	1
<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,5	1,5	1	0,75	1,5	2	3	3	1
<i>Mentha piperita</i>	1,5	1,5	1	1,5	3	2	3	3	1
<i>Ocimum basilicum</i>	0,75	0,75	1	0,187	0,75	4	3	3	1
<i>Thymus vulgaris</i>	<0,023	<0,023	-	<0,023	<0,023	-	<0,023	<0,023	-



## Discussão

A composição da microbiota dos animais é altamente sensível às mudanças na dieta, e a inclusão de aditivos com efeito antimicrobiano pode afetar esta composição de forma positiva ou negativa. Alguns trabalhos têm mostrado que OEs podem modular a microbiota de animais de produção, eliminando parcialmente algumas bactérias oportunistas e favorecendo o aumento da população de bactérias benéficas (Ahmed et al., 2013; Cho et al., 2014; Al-Sagheer et al., 2017). Para isso, o estudo *in vitro* de CIM e CBM para seleção das moléculas promissoras são necessários.

Seguindo a classificação do potencial antimicrobiano dos produtos de plantas proposta por Aliannis et al. (2001), neste capítulo, foi observado que ambos *M. alternifolia* e *M. piperita* apresentam fraca atividade contra as bactérias testadas. Em contraste, o OE de *T. vulgaris* apresentou uma forte atividade contra as bactérias oportunistas avaliadas (*Aeromonas* e *Edwardsiella*) de peixes, e contra a bactéria gram positiva (*S. aureus*).

Em um dos escassos trabalhos realizados em peixes, a adição de carvacrol e timol na ração foi capaz de modular a microbiota intestinal de truta *Oncorhynchus mykiss* (Giannenas et al. 2012), porém, os autores destacaram a necessidade de mais estudos. Como mostrado aqui, o timol é o principal componente do OE de *T. vulgaris*, portanto, recomendamos que o seu efeito sobre a microbiota de peixes deve ser estudado usando-o na ração. Existe apenas um estudo sobre o efeito deste OE na microbiota de peixe, em que Navarrete et al. (2010) não encontraram alteração da microbiota de trutas alimentadas até a concentração de 20 mg/kg, porém os próprios autores destacaram a necessidade de estudar doses maiores do que as testadas no trabalho.

Como conclusão, os OEs de *M. alternifolia* e *M. piperita*, previamente estudados no capítulo 2, mostraram ter pouca possibilidade de modular a microbiota se adicionados à ração. Ao contrário, o *T. vulgaris* mostrou forte atividade *in vitro*, indicando que pode ser capaz de modular a microbiota dos peixes se adicionado na ração. Este estudo revelou a atividade antibacteriana de diferentes OEs e estimulou a realização do capítulo 4 da presente tese, em que foram avaliados o efeito do *T. vulgaris* na saúde geral e intestinal da tilápia-do-Nilo.

#### Referências

- Ahmed, S. T., Hossain, M. E., Kim, G. M., Hwang, J. A., Ji, H., & Yang, C. J. (2013). Effects of resveratrol and essential oils on growth performance, immunity, digestibility and fecal microbial shedding in challenged piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(5), 683-690.
- Aliagiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 40: 4168-4170
- Al-Sagheer, A. A., Mahmoud, H. K., Reda, F. M., Mahgoub, S. A., & Ayyat, M. S. (2017). Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquaculture Nutrition*. doi: 10.1111/anu.12637
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.

Bulfon, C., Volpatti, D., & Galeotti, M. (2014). In vitro antibacterial activity of plant ethanolic extracts against fish pathogens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(5), 545-557.

Chang, H. Y., Lai, J. M., & Wang, J. H. (2016). The minimum inhibitory concentration of antibiotics against nocardia seriolae isolation from diseased fish in taiwan. *Taiwan Veterinary Journal*, 42(02), 81-84.

Cho, J. H., Kim, H. J., & Kim, I. H. (2014). Effects of phytogetic feed additive on growth performance, digestibility, blood metabolites, intestinal microbiota, meat color and relative organ weight after oral challenge with *Clostridium perfringens* in broilers. *Livestock Science*, 160, 82-88.

Giannenas, I., Triantafillou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T., & Karagouni, E. (2012). Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350, 26-32.

Michel, C., Matte-Tailliez, O., Kerouault, B., & Bernardet, J. F. (2005). Resistance pattern and assessment of phenicol agents' minimum inhibitory concentration in multiple drug resistant *Chryseobacterium* isolates from fish and aquatic habitats. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 323-332.

Muniruzzaman, M., & Chowdhury, M. B. R. (2004). Sensitivity of fish pathogenic bacteria to various medicinal herbs. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 2(1), 75-82.

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. *Aquaculture Research*, 41(10), 667-678.

Nayak, SK. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29:2-14.

Oliveira, F. P. D., Lima, E. D. O., Siqueira Júnior, J. P. D., Souza, E. L. D., Santos, B. H. C., & Barreto, H. M. (2006). Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(4), 510-516.

Osorio, A., Silva, T. M., Duarte, L. P., Ferraz, V. P., Pereira, M. T., Mercadante-Simões, M. O., Evangelista, F. C. G., Sabino, A. P., & Alcântara, A. F. (2015). Essential oil from flowers of *Solanum stipulaceum*: Composition, effects of  $\gamma$ -radiation, and antileukemic activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(11), 2233-2240.

Sebastião, F. A., Furlan, L. R., Hashimoto, D. T., & Pilarski, F. (2015). Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. *Advances in Microbiology*, 5(06), 409-424.

Yáñez, A. J., Valenzuela, K., Matzner, C., Olavarría, V., Figueroa, J., Avendaño-Herrera, R., & Carcamo, J. G. (2014). Broth microdilution protocol for minimum inhibitory concentration (MIC) determinations of the intracellular salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* to florfenicol and oxytetracycline. *Journal of Fish Diseases*, 37(5), 505-509.

**Capítulo 4** – Manuscrito nas normas do periódico “Aquaculture Research”

Effect of thyme essential oil on haemato-immunological indices, intestinal morphology and microbiota of Nile tilapia

Gustavo Moraes Ramos Valladão<sup>1</sup>, Sílvia Umeda Gallani<sup>1</sup>, Suzana Kotzent<sup>2</sup>, Inácio Mateus Assane<sup>1</sup>, and Fabiana Pilarski<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>Post-graduate programme in Aquaculture, Laboratory of Microbiology and Parasitology of Aquatic Organisms, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, SP, Brazil, 14884-900

<sup>2</sup>Post-graduate programme in Agricultural Microbiology, Laboratory of Microbiology and Parasitology of Aquatic Organisms, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, SP, Brazil, 14884-900

\*Corresponding author:

E-mail: [fabianap@caunesp.unesp.br](mailto:fabianap@caunesp.unesp.br)

Short running title: Thyme essential oil for Nile tilapia.

## Abstract

Thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil (TVEO) is an herbal medicine with one of the highest levels of antimicrobial activity. Although TVEO has been broadly used in poultry and swine production due to its immunostimulant and growth-promoting characteristics, the effects of TVEO on fish is poorly known. In this study, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) were fed 0, 0.1, 0.5 and 1% TVEO for 15 days. Subsequently, blood parameters, intestinal morphology and the population of *Bacillus* bacteria in the intestine were evaluated. The number of lymphocytes ( $P < 0.05$ ) and leukocytes ( $P < 0.05$ ) significantly increased in the blood of the fish fed the highest dose of TVEO. Based on the normal behaviour of the fish and the alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels, which were not altered ( $P > 0.05$ ), this study concluded that the diets were safe and showed no negative or toxic effects. Even at doses of up to 1%, TVEO did not alter the population of beneficial *Bacillus* bacteria in the gut. In conclusion, supplementation with TVEO stimulated the cellular components of the nonspecific immune response of Nile tilapia without causing deleterious effects or altering the population of important intestinal bacteria.

**Keywords:** herbal medicine, *Bacillus*, immunostimulant, innate immunity, plant extract

## Introduction

Thyme (*Thymus vulgaris*), is a plant that belongs to the family Lamiaceae and is widely known for its antiseptic and antioxidant properties (Raut & Karuppayil, 2014). The primary constituent of thyme essential oil (TVEO) is thymol, which typically accounts for its biological and pharmacological activities (Dauqan & Abdullah, 2017); however, due to the synergy among all the constituents, the integral essential oil (EO) may present different effects compared with the isolated substances. In several screenings evaluating its potential antibacterial effect, TVEO demonstrated stronger activity in comparison with other EOs (Fabio, Cermelli, Fabio, Nicoletti & Quaglio, 2007; Gutierrez, Rodriguez, Barry-Ryan & Bourke, 2008; Abdollahzadeh, Rezaei & Hosseini, 2014; Raut & Karuppayil, 2014), making it a promising substance for the pharmaceutical, food and animal industries.

Based on its biological and pharmacological benefits, researchers have studied the inclusion of TVEO in animal diets (Navarrete et al., 2010; Placha et al., 2014; Saleh, Allam, El-latif & Ghazy, 2014). In poultry science, TVEO has been shown to significantly improve the integrity of the intestinal barrier; antioxidant status (Placha et al., 2014); and haematological, biochemical and immunological parameters (Saleh et al., 2014) and is being proposed as a promising alternative to the use of antibiotics (Khan, Naz, Nikousefat, Tufarelli & Laudadio, 2012).

In aquaculture, the dietary inclusion of TVEO has been largely unexplored, but it has been shown to be effective in enhancing the growth and antioxidant enzyme profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) (Sönmez et al., 2015), and in altering the frequency of lymphoid aggregates in the intestine of the gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus) (Hernández, García, Caballero & Hernández, 2016). To our knowledge, only one study has investigated the effect of TVEO on fish microbiota, in

which Navarrete et al. (2010) found no significant effect of EO supplementation in rainbow trout at concentrations of up to 20 mg kg<sup>-1</sup>. This lack of studies highlights the need for additional studies to evaluate the *in vivo* effects of higher rates of supplementation of TVEO on fish microbiota.

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.), is a major species produced in captivity worldwide, and its production is expanding in Asia, South America and Africa to supply the growing demand in markets from several countries (FAO, 2016). Tilapia farming is notorious for its intensity, and the fish commonly experience stress and immunosuppression under such conditions, which leads to a loss of productivity and facilitates the occurrence of disease. Therefore, researchers have studied the use of immunostimulants, growth promoters and intestinal modulators for this species (Song et al., 2014; Van Hai, 2015; Haygood & Jha, 2016). Among the few recent findings on the use of EOs for Nile tilapia, there are indications that *Cinnamomum* sp. increases  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-globulins and lipid deposition in the carcass (Santos et al., 2016); *Melaleuca alternifolia* increases villi length; *Mentha piperita* and *M. alternifolia* activate the complement system (Valladão et al., 2017); and *Cymbopogon citratus* and *Pelargonium graveolens* improve growth performance, feed utilization, oxidative status, immune response and disease resistance (Al-Sagheer, Mahmoud, Reda, Mahgoub & Ayyat, 2017).

Based in all the information, data on the haemato-immunological and biochemical parameters, intestinal histology and microbiota of Nile tilapia fed diets containing up to 1% TVEO for 15 days were evaluated.



## **Material and Methods**

### **Study 1**

#### **Fish and experimental conditions**

Healthy Nile tilapia were purchased from a commercial fish farm and were kept in 500 L tanks with constant aeration and open water flow for acclimation for one month prior to the experiment. Two hundred and sixty fish ( $80.66 \pm 8.82$  g) were distributed randomly and equally (13 fish per tank) among four groups with five replicates (20 tanks). The water parameters were evaluated every three days using a YSI 55 probe to measure dissolved oxygen and temperature. The levels of dissolved oxygen and temperature were  $5.63 \pm 0.54$  (mg L<sup>-1</sup>) and  $28.85 \pm 0.44$  (°C), respectively, for the control group;  $5.31 \pm 0.28$  (mg L<sup>-1</sup>) and  $28.99 \pm 0.35$  (°C) for the 0.1% TVEO group;  $5.49 \pm 0.69$  (mg L<sup>-1</sup>) and  $28.94 \pm 0.62$  (°C) for the 0.5% TVEO group; and  $5.34 \pm 0.37$  (mg L<sup>-1</sup>) and  $29.13 \pm 0.30$  (°C) for the 1% TVEO group. All the parameters were appropriate for fish maintenance and did not differ among the groups.

The experiment was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the School of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine at Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil, under protocol number 13019/15. The approval was consistent with the ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

#### ***Thymus vulgaris* essential oil (TVEO) and diet**

TVEO was purchased from Phytoterapica® (São Paulo, Brazil) and added to an extruded (3-4 mm) commercial feed (Trouw Nutrition®, Brazil) at concentrations of 0% (control), 0.1%, 0.5% and 1% with 4% soybean oil. Specifically, the EO and the soybean oil were weighed on a precision scale (Mark 210A, Bel Engineering), mixed

and manually added to the commercial feed using the same technique used for the inclusion of antibiotics or probiotics at fish farms. The diets were produced daily to guarantee the EO composition and were offered to fish twice a day at 3% live weight for 15 days. The composition of the commercial base diet used in this study was analysed using the protocols of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006) and is presented in Table 1.

The TVEO was analysed by gas chromatography (GC) with a flame ionization detector (FID) using an Agilent HP 7820A system (Agilent Technologies Inc., USA). Specifically, separations were conducted using Agilent-fused silica capillary HP-5 columns (30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ). The GC temperature profile was as follows: the initial temperature was 50°C with an increase of 3°C  $\text{min}^{-1}$  to 200°C, an injector temperature of 200°C, an injection volume of 1  $\mu\text{L}$ , a split ratio adjusted to 50:1, and an FID detector temperature of 220°C. The obtained data were analysed using EZChrom Elite Compact software, and the components were identified via a linear retention index based on the Kováts method. In addition, GC/mass spectrometry (MS) was performed using a Shimadzu QP2010 ULTRA system (Shimadzu, Japan) to confirm the GC-FID results following the steps described by Osorio et al. (2015). The identification of the EO constituents was confirmed by comparison with data available in the library NIST11.

Table 1. Proximate composition of the base diets used in the two studies and the supplementation with thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil (TVEO).

Composition	Base diet			
	Study 1	Study 2		
Dry matter (%)	91.58	92.56		
Crude protein (%)	31.96	35.31		
Ether extract (%)	2.85	4.43		
Ash (%)	12.47	8.34		
Energy (cal g <sup>-1</sup> )	3,930.00	4,407.00		
NDF (%)	22.82	20.94		
ADF (%)	10.04	8.32		
Supplementation	Control	0.1% TVEO	0.5% TVEO	1.0% TVEO
TVEO (g kg <sup>-1</sup> )	0	1	5	10
Soya oil (g kg <sup>-1</sup> )	40			

NDF: neutral detergent fibre; ADF: acid detergent fibre.

Table 2. Chemical composition of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil (TVEO) used in two different studies.

TVEO constituents (%)	Study 1	Study 2
$\alpha$ -pinene	2.5	2.4
myrcene	0.6	0.7
$\alpha$ -terpinene	0.9	1.4
o-cimene	31.3	33.4
limonene	2.2	2.1
1,8-cineol	0.9	1.1
$\gamma$ -terpinene	0.3	0.3
terpinolene	0.4	0.3
linalool	7	6.7
isoborneol	1.2	1.2
thymol methyl ether	0.3	0.4
dihydrocarvone	0.6	0.6
thymol	41.6	37.5
carvacrol	8.7	7.8
$\beta$ -caryophyllene	0.8	0.7

### **Blood parameters**

After 15 days of treatment, two fish per tank (10 per group) were collected for an analysis of all blood (biochemical and haemato-immunological) indices. The blood was collected from the caudal vessel of fish anaesthetized in a benzocaine solution (100 mg L<sup>-1</sup>). These fish were sacrificed and subsequently destined to the collection of the

intestine for the accomplishment of histological technique and analysis of its morphology.

#### *Haematological analyses*

An aliquot of blood was heparinized to perform the total count of red blood cells (RBC) using the method of Hesser (1960) and to perform an analysis of respiratory burst activity. The remaining blood (without heparin) was left to clot for 2 h at room temperature. Clotted blood was centrifuged at 3000 g for 10 min (4°C) to obtain serum for biochemical and immunological analyses.

Blood smears were stained with a May Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW) stain. Total thrombocytes and leucocytes were quantified by counting 2000 RBC, and a differential count of 200 white blood cells was performed (Ranzani-Paiva, Pádua, Tavares-Dias & Egami, 2003).

#### *Biochemical analyses*

Serum protein and albumin were assessed by spectrophotometry (Unico 2100 Spectrophotometer) using Labtest® kits (99-250 and 19-1/250, respectively). The globulin data were calculated by subtracting the amount of albumin from the total protein; the results were expressed in g dL<sup>-1</sup>.

The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were quantified using Labtest® kits (108 and 109, respectively) in a UV/VIS spectrophotometer (Genesys 10S); the values were expressed in UI L<sup>-1</sup>.

#### *Immunological analyses*

Respiratory burst activity was quantified as described by Biller-Takahashi, Takahashi, Saita, Gimbo & Urbinati (2013), which is based on the reduction of nitrobluetetrazolium (Sigma) into a precipitate of formazan granules and is measured using a spectrophotometer (Unico 2100 Spectrophotometer). The result was expressed as the optical density (OD).

The serum lysozyme concentration was measured using an ELISA reader (Thermoplate Reader Mn) as described by Ellis (1990), which is based on the lysis of *Micrococcus lysodeikticus*. The values were expressed in  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

The complement system activity (ACH50) was assayed in serum using rabbit erythrocytes according to the protocol described by Zanuzzo, Urbinati, Rise, Hall & Nash (2015); each sample was measured as the time (minutes) required for the initial OD to be reduced by half (indicating a 50% lysis of rabbit erythrocytes in response to the activation of the complement system).

### **Intestinal morphology**

Two fish from each tank (10 per group) were collected on day 15 to investigate the intestinal morphology. At necropsy, approximately 2 cm of the midgut was excised and fixed in buffered formalin (10%). The tissue was subsequently transferred to 70% alcohol and processed for paraffin embedding. Histological sections were stained with a periodic acid-Schiff (PAS) stain.

Individual slides of the intestine were analysed using a Nikon Eclipse E200@ optical microscope (Nikon), and photomicrographs were captured with a Moticam 2300 camera (Motic). To measure the length and thickness of the villi, photomicrographs were taken at a magnification of 100x. For the quantification of goblet cells and intraepithelial lymphocytes (IELs), photomicrographs were taken at a magnification of

400x using a grid with a systematic set of random windows of known area (Gundersen, 1977); data were presented as the number of cells per 100 enterocytes.

## **Study 2**

### **Fish and study design**

One hundred and twenty-eight fish ( $66.47 \pm 7.40$  g) were equally and randomly divided into 16 tanks (140 L). The tanks were randomly assigned to one of four treatments with four replicates; all tanks received open water flow from the same source. The water parameters were measured every three days using a Horiba U50 multi-parameter probe (Horiba) and did not differ among groups. The mean values of dissolved oxygen ( $\text{mg L}^{-1}$ ), temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and pH were  $4.63 \pm 0.72$ ,  $30.72 \pm 0.21$  and  $7.12 \pm 0.13$ , respectively.

### ***Thymus vulgaris* essential oil (TVEO) and diet**

The EO was added to the diet using the same technique described for Study 1. The fish were fed for 15 days (3% of live weight per day) with 0%, 0.1%, 0.5% or 1% TVEO. The analysis of the feed composition (Table 1) and TVEO (Table 2) were performed using the same method described for Study 1.

### **Quantification of intestinal bacteria**

Quantitative PCR (qPCR) was conducted to compare the number of beneficial bacteria of the genus *Bacillus* in the intestine of Nile tilapia from each group.

### ***Primers***

Specific primers (for qPCR) for the *Bacillus* genus, plus primers for total bacteria were acquired (Life Technologies, São Paulo, Brazil) based on previous studies by Han et al. (2012) and Ren et al. (2013) (Table 3).

Table 3. Target primers used in the quantification of bacteria by qPCR.

Bacterial target	Sequences	Size (bp)
Total bacteria <sup>1</sup>	F: CGGCAACGAGCGCAACCC R: CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	130
<i>Bacillus</i> <sup>2</sup>	F: GCAACGAGCGCAACCCTTGA R: TCATCCCCACCTTCCTCCGGT	92

<sup>1</sup>Primer based on the study of Ren et al. (2013); <sup>2</sup>Primer based on the study of Han et al. (2012).

The specificity of each primer was tested and confirmed through standard PCR using previously sequenced bacterial strains (*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* spp., *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp. and *Lactobacillus* spp.) as templates. The DNA of the bacterial strains was extracted and purified using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions for bacteria. Conventional PCR was performed in a thermocycler (ProFlex PCR System, Applied Biosystems) using the following conditions: denaturation at 95°C for 5 min (1x); 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, 72°C for 30 sec (30x); and a final extension of 72°C for 10 min (1x). The PCR mix (per reaction) was as follows: MilliQ water (23.1 µL), 10x PCR buffer (3 µL), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (2.4 µL), 10 mM dNTPs (0.6 µL), forward primer (0.3 µL), reverse primer (0.3 µL), 5 U µL<sup>-1</sup> Taq polymerase (0.3 µL) and template (1 µL) (all reagents from Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brazil). The primer specificity was confirmed by gel



electrophoresis (2%), where only specific genes corresponding to the bacterial species were amplified by the primer; the exception was the total bacteria primer, which amplified DNA from all bacteria tested.

#### *Collection of intestine and DNA extraction*

The entire intestine of each fish was fractionated with sterile scissors and deposited in a sterile Falcon tube (50 mL) with 30 mL of a dissociation buffer with 0.1% Tween 80, 1% methanol and 1% tert-butanol following the methodology of Tran et al. (2017) with minor modifications. The modifications included the addition of 20 sterile glass beads to the Falcon tube and vortexing for 1 min to ensure maximum dissociation of the bacteria present in both the intestinal wall and faecal particles. The material was centrifuged at 500 g for 30 s, and the supernatant was recovered in a new sterile tube. Finally, the material was centrifuged at 10000 g for 20 min, and the pellet was used for DNA extraction according to manufacturer's recommendations (QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen). DNA quantification and extraction quality were analysed using Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific).

#### *Quantitative PCR (qPCR)*

The qPCR was performed using a 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) in a total volume of 20  $\mu$ L containing 2X Power SYBR Green (10  $\mu$ L), 10 mM forward primer (1  $\mu$ L), 10 mM reverse primer (1  $\mu$ L), ~50 ng genomic DNA template (6  $\mu$ L) and 2  $\mu$ L of dH<sub>2</sub>O. The thermal cycling protocol was as follows: denaturation at 95°C for 5 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, annealing at 60°C for 30 s and elongation at 72°C for 30 s. To determine the specificity of the amplification, an analysis of the melting curve was performed.

Quantification was performed to compare the proportion of *Bacillus* among groups, and the results were expressed following the equation recommended by Pfaffl (2004):  $2^{-(Ct_{Bacillus} - Ct_{total\ bacteria})}$ , where Ct is the cycle number at which the fluorescence generated within a reaction crosses the fluorescence threshold.

### **Statistical analysis**

All the values obtained in both studies were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation and analysed using SigmaStat (version 3.5) software. All the data were examined for normality and homogeneity of variance and analysed using a one-way ANOVA. Significant results ( $P < 0.05$ ) from the dependent variables were tested with the Tukey multiple comparison test of means using a significance level of 0.05. Rare non-normal data were normalized using a square root transformation.

## **Results**

### **Study 1**

#### **Blood parameters**

##### *Haematological analyses*

The blood cells of the fish fed different concentrations of TVEO during the study showed significant changes. The total leukocyte count was significantly increased in the 1% TVEO group compared with that in the control ( $P < 0.05$ ) after 15 days of feeding (Figure 1).

In the differential leukocyte count, the number of lymphocytes in the blood of the tilapia fed high doses of TVEO (0.5% and 1%) was higher than that in the control (Figure 1). In addition, although there was no significant difference, the data on neutrophils, monocytes and basophils showed a clear upward trend with an increasing

level of TVEO. The neutrophils increased by 32 and 37%, the monocytes increased by 58 and 76%, and the basophils increased by 173 and 118% in the 0.5 and 1% TVEO groups, respectively, compared with those in the control (Figure 1).

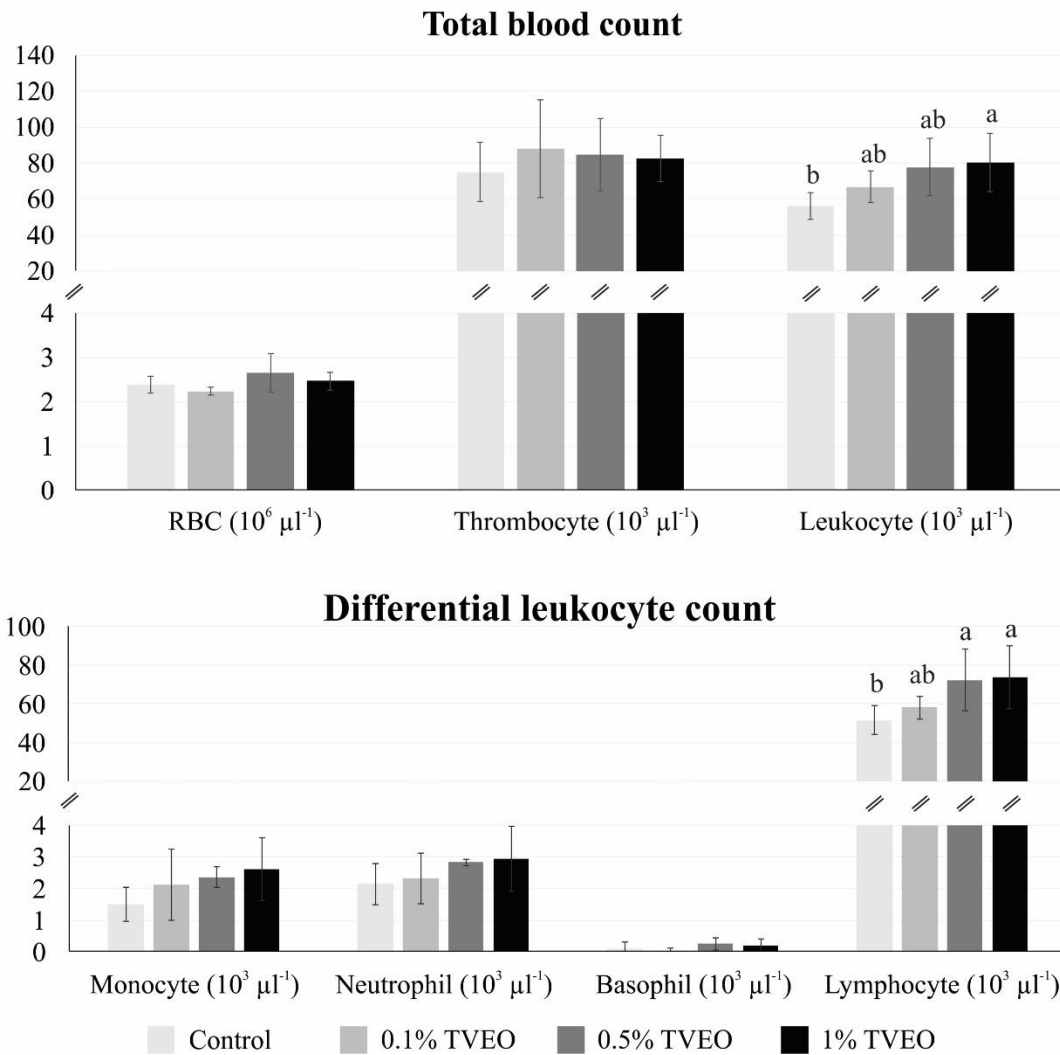


Figure 1. Total blood cell count and leukocyte differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil (TVEO) for 15 days.

RBC: Red blood cell.

### Biochemical analyses

Supplementation with TVEO had no influence on the biochemical parameters of the Nile tilapia under the conditions tested. The levels of protein, albumin, globulin, ALT and AST did not differ from the control group ( $P > 0.05$ ) (Table 4).

Table 4. Biochemical parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil (TVEO).

Item	Control	0.1% TVEO	0.5% TVEO	1.0% TVEO
Protein (g dL <sup>-1</sup> )	2.85 ± 0.16	2.96 ± 0.27	2.87 ± 0.22	2.86 ± 0.30
Albumin (g dL <sup>-1</sup> )	0.71 ± 0.10	0.68 ± 0.12	0.67 ± 0.11	0.66 ± 0.03
Globulin (g dL <sup>-1</sup> )	2.15 ± 0.08	2.27 ± 0.22	2.20 ± 0.12	2.21 ± 0.27
ALT (UI L <sup>-1</sup> )	2.34 ± 0.89	2.89 ± 1.20	2.64 ± 1.57	2.18 ± 1.12
AST (UI L <sup>-1</sup> )	26.78 ± 14.73	15.04 ± 6.31	28.46 ± 5.00	26.36 ± 5.45

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase.

### Immunological analyses

The parameters of respiratory burst activity, lysozyme concentration and ACH50 activity were not altered by feeding diets containing TVEO when compared with those in the control ( $P > 0.05$ ) (Table 5).

Table 5. Immunological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil (TVEO).

Item	Control	0.1% TVEO	0.5% TVEO	1.0% TVEO
Respiratory burst activity (optical density)	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.05	0.31 ± 0.04	0.31 ± 0.07

ACH50 (minutes)	2.10 ± 0.48	2.78 ± 1.11	2.13 ± 0.74	2.51 ± 0.73
Lysozyme (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	5.64 ± 1.42	5.29 ± 4.20	3.85 ± 1.74	5.77 ± 1.88

ACH50: complement system activity.

### **Intestinal morphology**

Dietary inclusion of TVEO for 15 days did not alter the intestinal morphology or the number of goblet cells and IELs ( $P > 0.05$ ) (Table 6).

### **Study 2**

#### **Quantification of intestinal bacteria**

The comparison of the delta Ct indicated that the use of TVEO for 15 days did not alter the population of beneficial *Bacillus* bacteria ( $P > 0.05$ ) present in the gut of the Nile tilapia (Table 7).

Table 6. Morphometric measurements and intestinal cell quantification of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil (TVEO).

Item	Control	0.1% TVEO	0.5% TVEO	1.0% TVEO
Villi length ( $\mu\text{m}$ )	331.35 $\pm$ 56.66	391.66 $\pm$ 100.20	330.66 $\pm$ 49.09	355.40 $\pm$ 63.09
Villous thickness ( $\mu\text{m}$ )	102.55 $\pm$ 6.42	103.04 $\pm$ 9.19	116.11 $\pm$ 16.00	108.81 $\pm$ 10.16
Goblet cells (per 100 enterocytes)	5.38 $\pm$ 0.70	6.05 $\pm$ 0.64	7.29 $\pm$ 1.65	5.63 $\pm$ 0.38
Intraepithelial lymphocytes (per 100 enterocytes)	30.04 $\pm$ 12.20	32.15 $\pm$ 4.03	29.35 $\pm$ 6.34	30.65 $\pm$ 4.32

Table 7. Quantification of intestinal bacteria in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil (TVEO) using the threshold values method (Ct).

Item	Control	0.1% TVEO	0.5% TVEO	1.0% TVEO
CT total bacteria	17.69 $\pm$ 2.96	17.77 $\pm$ 1.81	17.73 $\pm$ 1.20	16.25 $\pm$ 1.35
CT <i>Bacillus</i>	28.96 $\pm$ 3.25	28.34 $\pm$ 2.33	28.16 $\pm$ 1.34	27.86 $\pm$ 3.20
Delta CT	11.27 $\pm$ 2.89	10.57 $\pm$ 2.00	10.43 $\pm$ 1.60	11.61 $\pm$ 4.18
$2^{-(\text{Ct Bacillus} - \text{Ct total bacteria})}$	0.0012 $\pm$ 0.0014	0.0011 $\pm$ 0.0011	0.0013 $\pm$ 0.0017	0.0053 $\pm$ 0.0104

## **Discussion**

Due to the promising effects of herbal medicines, researchers in aquaculture have been studying the immunostimulant (Sutuli, Gatlin, Heinzmann & Baldisserotto, 2017) and antimicrobial (Valladão, Gallani & Pilarski, 2015) effects of medicinal herbs. This study shows that diets supplemented with TVEO increased the number of cells involved in the immune response of the fish, had no toxic effects on the animal and did not negatively affect the population of beneficial intestinal bacteria.

With regard to the haematological changes observed in the fish fed the highest doses of TVEO, the sum of monocytes, neutrophils and basophils together with a significant increase in lymphocytes culminated in a significant increase in total leukocytes. The innate immune system has both cellular and humoral components, through which it carries out its protective function; leukocytes are the major component of the innate immune system at the cellular level (Vallejos-Vidal, Reyes-Lopez, Teles & MacKenzie, 2016). In general, leukocytes are armed with an intracellular and extracellular defence system that allows the spread of pathogens to be limited (Rieger & Barreda, 2011) through direct cell-antigen contact or the secretion of soluble antigen receptors that are sent throughout the animal body (Scapigliati, 2013). In addition, leukocytes are responsible for the initiation of an adaptive immune response and the subsequent resolution of an inflammatory response and tissue repair (Vallejos-Vidal et al., 2016). Based on this information, TVEO shows a promising immunostimulating effect on the cellular components of the nonspecific immune response of the fish.

The activities of the ALT and AST enzymes are typically increased in response to exposure to pollution or toxic agents and are evaluated to assess possible damage to the hepatocytes or liver tissue (Zadmajid & Mohammadi, 2017). The activity of these enzymes can also be altered according to the metabolism of the substances present in

the diet; however, the inclusion of up to 1% TVEO over 15 days was not sufficient to alter enzyme activity, showing TVEO to be a safe additive under these conditions. However, Zadmajid & Mohammadi (2017) reported that fish exposed to silver nanoparticles (a situation that increases the activity of ALT and AST) had a lower activity of these enzymes when fed TVEO, suggesting that TVEO may act to protect hepatocytes and that this protection could occur by means of a stabilized cell membrane or by exerting antioxidative effects. Thus, in addition to being safe for fish under normal conditions, a TVEO-containing diet may be beneficial under conditions in which the fish suffer from exposure to deleterious agents and toxic compounds.

Feeding supplements for a short period (15 days) is a common strategy designed to prevent challenges that occur in fish farming. However, this period of administration does not appear to be sufficient to alter the intestinal morphology of the fish, as shown here. The most recent studies (Zeppenfeld et al., 2016; Valladão et al., 2017) have shown that at least 60 days of feeding with EOs were necessary to produce a change in the morphology of the intestine. Based on this evidence, longer periods of administration of EOs are recommended when the goal is an increase in the number of intestinal cells or an increase in villi.

Several *in vitro* studies (Fabio et al., 2007; Gutierrez et al., 2008; Abdollahzadeh et al., 2014; Raut & Karuppayil, 2014) have shown that TVEO has strong activity against bacteria when compared with other EOs. In this study, there was no decrease in the bacterial population of the genus *Bacillus* in the tilapia that received the TVEO. Bacteria of this genus are known to be beneficial to the gut and to the general health of the host (Olmos & Paniagua-Michel, 2014; Zorriehzahra et al., 2016), and the fact that the immunostimulatory potential of this additive did not adversely affect the fish microbiota is considered promising. As previously described by other authors



(Ouwehand et al., 2010; Ambrosio, Alencar, Sousa, Moreno & Gloria, 2017), it is desirable that the EO acts selectively against pathogenic bacteria and not against the beneficial bacteria of the gastrointestinal tract. There are few studies on the effects of EOs on fish gut microbiota (Navarrete et al., 2010; Sutuli et al., 2016), and based on molecular analyses, none of these studies have observed such modulation. This can be due to several factors, such as: OEs may be rapidly absorbed by the fish, not allowing the necessary time of contact with the microbiota to act; a portion of the OEs or their totality may be affected by the action of digestion or their interaction with the organic matter present in the intestine, causing the OE concentration to be too low to influence the microbiota. One strategy that can avoid these problems is the protection of EOs (encapsulation), which will allow the molecules to reach the intestine intact at the desired doses. However, Al-Sagheer, Mahmoud, Reda, Mahgoub & Ayyat (2017) recently used conventional microbiology to show that the EOs of *Cymbopogon citratus* and *Pelargonium graveolens* are capable to decrease the counts of total bacteria, coliforms and *Aeromonas* spp. in the gut of Nile tilapia.

In conclusion, short period of supplementation with TVEO stimulated the cellular components of the non-specific immune response of tilapia without deleterious effects on the general health of the fish or the intestinal tract.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (140487/2014-0), and the São Paulo Research Foundation, FAPESP (2014/14039-9). The authors thank Dra. Vany P. Ferraz (Chromatography Laboratory, Department of Chemistry, UFMG) for assistance with the analysis of the EOs.

## References

Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35, 177-183. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.004

Al-Sagheer, A. A., Mahmoud, H. K., Reda, F. M., Mahgoub, S. A., & Ayyat, M. S. (2017). Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquaculture Nutrition*. doi: 10.1111/anu.12637

Ambrosio, C. M., de Alencar, S. M., de Sousa, R. L., Moreno, A. M., & Da Gloria, E. M. (2017). Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*, 97, 128-136. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.11.045

AOAC, 2006. Official methods of analysis (18th edn). Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists.

Biller-Takahashi J. D., Takahashi L. S., Saita M. V., Gimbo R. Y., Urbinati E. C. (2013). Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, 73, 425-429. doi: 10.1590/S1519-69842013000200026

Dauqan, E. M., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(02), 017-022. doi: 10.7324/JABB.2017.50203

Ellis A. E. (1990). Lysozyme Assays. In J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson & W. B. Muiswinkel (Eds.), *Techniques In Fish Immunology* (pp. 101-103). California: Sos Publications.

Fabio, A., Cermelli, C., Fabio, G., Nicoletti, P., & Quaglio, P. (2007). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytotherapy Research*, 21, 374-377. doi: 10.1002/ptr.1968

FAO. (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome: 200 pp.

Gutierrez, J., Rodriguez, G., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: antimicrobial and sensory screening. *Journal of Food Protection*, 71, 1846-1854. doi: 10.4315/0362-028X-71.9.1846

Han, G. Q., Xiang, Z. T., Yu, B., Chen, D. W., Qi, H. W., Mao, X. B., Chen, H., Mao, Q., & Huang, Z. Q. (2012). Effects of different starch sources on *Bacillus* spp. in intestinal tract and expression of intestinal development related genes of weanling piglets. *Molecular Biology Reports*, 39, 1869-1876. doi: 10.1007/s11033-011-0932-x

Haygood, A. M., & Jha, R. (2016). Strategies to modulate the intestinal microbiota of Tilapia (*Oreochromis* sp.) in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*. doi: 10.1111/raq.12162

Hernández, A., García, B. G., Caballero, M. J., & Hernández, M. D. (2016). The inclusion of thyme essential oil in the feed of gilthead seabream (*Sparus aurata*) promotes changes in the frequency of lymphocyte aggregates in gut-associated lymphoid tissue. *Aquaculture Research*, 47, 3341-3345. doi: 10.1111/are.12758

Khan, R. U., Naz, S., Nikousefat, Z., Tufarelli, V., & Laudadio, V. (2012). *Thymus vulgaris*: alternative to antibiotics in poultry feed. *World's Poultry Science Journal*, 68, 401-408. doi: 10.1017/S0043933912000517

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. *Aquaculture Research*, 41, 667-678. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02590.x

Olmos, J., & Paniagua-Michel, J. (2014). *Bacillus subtilis* a potential probiotic Bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 6, 361-365. doi: 10.4172/1948-5948.1000169

Osorio, A., Silva, T. M., Duarte, L. P., Ferraz, V. P., Pereira, M. T., Mercadante-Simões, M. O., Evangelista, F. C. G., Sabino, A. P., & Alcântara, A. F. (2015). Essential oil from flowers of *Solanum stipulaceum*: Composition, effects of  $\gamma$ -radiation, and antileukemic activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(11), 2233-2240. doi: 10.5935/0103-5053.20150209.

Ouwehand, A. C., Tiihonen, K., Kettunen, H., Peuranen, S., Schulze, H., & Rautonen, N. (2010). In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Veterinarni Medicina*, 55(2), 71-78.

Pfaffl M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In S. A. Bustin (Ed.), *A-Z of quantitative PCR* (pp. 87 – 112). California: International University Line.

Placha, I., Takacova, J., Ryzner, M., Cobanova, K., Laukova, A., Strompfova, V., Venglovska, K., & Faix, S. (2014). Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. *British poultry science*, 55(1), 105-114. doi: 10.1080/00071668.2013.873772

Ranzani-Paiva, M. J. T., Pádua, S. B., Tavares-Dias, M., & Egami, M. I. (2013). Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá, PR: EDUEM.

Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.05.055

Ren, P., Xu, L., Yang, Y., He, S., Liu, W., Ringø, E., & Zhou, Z. (2013). *Lactobacillus planarum* subsp. *plantarum* JCM 1149 vs. *Aeromonas hydrophila* NJ-1 in the anterior intestine and posterior intestine of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus*♀×*Oreochromis aureus*♂: An ex vivo study. *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 146-153. doi: 10.1016/j.fsi.2013.04.023

Rieger, A. M., & Barreda, D. R. (2011). Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 35, 1238-1245. doi: 10.1016/j.dci.2011.03.009

Saleh, N., Allam, T., El-latif, A. A., & Ghazy, E. (2014). The effects of dietary supplementation of different levels of thyme (*Thymus vulgaris*) and ginger (*Zingiber officinale*) essential oils on performance, hematological, biochemical and immunological parameters of broiler chickens. *Global Veterinaria*, 12, 736-744. doi: 10.5829/idosi.gv.2014.12.06.83189

Santos, W. M., de Brito, T. S., Prado, S. D. A., de Oliveira, C. G., De Paula, A. C., de Melo, D. C., & Ribeiro, P. A. (2016). Cinnamon (*Cinnamomum* sp.) inclusion in diets for Nile tilapia submitted to acute hypoxic stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 551-555. doi: 10.1016/j.fsi.2016.04.135

Scapigliati, G. (2013). Functional aspects of fish lymphocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 41, 200-208. doi: 10.1016/j.dci.2013.05.012

Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., & Ringø, E. (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1), 40-48. doi: 10.1016/j.fsi.2014.06.016

Sönmez, A. Y., Bilen, S., Alak, G., Hisar, O., Yanık, T., & Biswas, G. (2015). Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 165-175. doi: 10.1007/s10695-014-0014-9

Sutili, F. J., Gatlin, D. M., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2017). Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*. doi: 10.1111/raq.12197

Sutili, F. J., Velasquez, A., Pinheiro, C. G., Heinzmann, B. M., Gatlin, D. M., & Baldisserotto, B. (2016). Evaluation of *Ocimum americanum* essential oil as an additive in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Fish & Shellfish Immunology*, 56, 155-161. doi: 10.1016/j.fsi.2016.07.008

Tran, N. T., Xiong, F., Hao, Y. T., Zhang, J., Wu, S. G., & Wang, G. T. (2017). Two biomass preparation methods provide insights into studying microbial communities of intestinal mucosa in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture Research*, 48, 4272–4283. doi: 10.1111/are.13248.

Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., & Pilarski, F. (2015). Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38, 417-428. doi: 10.1111/jvp.12202

Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Pala, G., Jesus, R. B., Kotzent, S., Costa, J. C., Silva T. F. A. & Pilarski, F. (2017). Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquaculture Research*, 48, 5640-5649. doi: 10.1111/are.13386

Vallejos-Vidal, E., Reyes-López, F., Teles, M., & MacKenzie, S. (2016). The response of fish to immunostimulant diets. *Fish & Shellfish Immunology*, 56, 34-69. doi: 10.1016/j.fsi.2016.06.028.

Van Hai, N. (2015). Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: a review. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 592-597. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.026

Zadmajid, V., & Mohammadi, C. H. (2017). Dietary thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) changes serum stress markers, enzyme activity, and hematological parameters in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to silver nanoparticles. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 16, 1063-1084.

Zanuzzo, F. S., Urbinati, E. C., Rise, M. L., Hall, J. R., Nash, G. W., & Gamperl, A. K. (2015). *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in Aloe vera fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, 435, 1-9. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.010

Zeppenfeld, C. C., Hernández, D. R., Santinón, J. J., Heinzmann, B. M., Cunha, M. A., Schmidt, D., & Baldisserotto, B. (2016). Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition*, 22, 933-940. doi: 10.1111/anu.12311

Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., & Lazado, C. C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: An update on their multiple modes of action: A review. *Veterinary Quarterly*, 36, 228-241. doi: 10.1080/01652176.2016.1172132

## Capítulo 5 - Considerações finais

A utilização indiscriminada de substâncias sem registro com grande potencial tóxico e até mesmo o uso de substâncias legalizadas de maneira irresponsável é preocupante, fazendo-se necessário o estudo de moléculas alternativas na aquicultura. Por isso, nossos estudos foram baseados na atual tendência na área de sanidade de peixes. Nesta tese, esclarecemos porque as pesquisas com o uso de OEs na aquicultura devem ser encorajadas, e mostramos potenciais uso para a *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Thymus vulgaris*.

Estas três plantas medicinais são conhecidas no meio acadêmico por seus efeitos antimicrobiano, antioxidante e imunoestimulante, tanto em estudos com animais quanto em humanos. Conforme citado ao longo do trabalho, essas plantas mostraram efeitos promissores quando adicionados na dieta de animais de produção como suínos e aves, no entanto, pouco se conhece sobre sua atuação na dieta de peixes. Neste ponto, contribuimos com resultados relativos à hematologia, bioquímica, imunologia, histologia, microbiologia e biologia molecular de peixes alimentados com os três OEs em diferentes tempos e concentrações de administração.

Em relação às análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas: na presente tese é evidenciado que os efeitos no peixe dependem da molécula, do tempo e da concentração da suplementação com OEs. Além disso, as respostas são inespecíficas (podem estar associado ao uso de prebióticos, probióticos, diferentes extratos de plantas, ou até resposta de uma infecção natural ou experimental). Em outras palavras, diversas moléculas podem causar uma resposta inespecífica na saúde dos peixes, no entanto, é preciso encontrar o tempo de exposição e a dose necessária para que isso ocorra.



Em relação à morfologia intestinal, baseado nos resultados deste estudo e na atual revisão de literatura, mesmo altas concentrações de OEs não garantem alteração da morfologia intestinal após curto tempo de administração. Esse parâmetro parece ser alterado somente com longos períodos de administração de um aditivo, ou seja, necessitando um maior tempo de suplementação, o que ocorreu após 2 meses de uso de *M. alternifolia* para tilápia-do-Nilo.

Mostramos também que o uso de OEs de *M. piperita* e *M. alternifolia* por longo período (2 meses) foi capaz de alterar de forma positiva a resposta humoral (sistema complemento). Enquanto que, altas concentrações do tomilho administrados durante menor período (15 dias) foram capazes de aumentar os componentes celulares do sistema imunológico. Além disso, as estratégias de suplementação testadas não apresentaram efeitos tóxicos aos peixes, se mostrando seguras até o momento.

Sobre o efeito dos OEs na microbiota de peixes, baseado nas respostas obtidas até o momento e na revisão de literatura, pode-se concluir que o efeito *in vitro* de diversas moléculas já está bem caracterizado e é possível notar que existem algumas delas com forte atividade contra bactérias causadoras de doenças, as quais são de interesse. No entanto, em grande parte dos estudos *in vivo*, estas moléculas não revelam toda sua capacidade. Isso pode ocorrer por diversos fatores, sendo que: os OEs podem estar sendo absorvidos rapidamente pelos peixes, não permitindo o tempo necessário de contato com a microbiota para agir; uma parte dos OEs ou sua totalidade pode estar sendo afetada pela ação da digestão ou pela interação com toda a matéria orgânica presente no intestino, fazendo com que altere sua atividade sobre os microrganismos ou com que a concentração do OE seja muito baixa para causar mudanças significativas. De fato, ambos fatores devem acontecer simultaneamente culminando na baixa atividade *in vivo*, sendo necessário doses extremamente altas para que uma mudança

ocorra, o que acaba se tornando inviável. Uma estratégia que poderá se tornar uma realidade e que poderá ajudar a reduzir o uso e o custo dos OEs na ração, é a sua microencapsulação (proteção) para que as moléculas cheguem íntegras ao intestino nas doses desejadas.

A partir dos próximos anos, a literatura sobre os OEs na aquicultura será ainda mais robusta e o grande desafio enfrentado por pesquisadores será a avaliação do custo benefício dessas suplementações na produção comercial de peixes. Sugerimos com este trabalho, que algumas questões deverão ser investigadas nos próximos anos para que os OEs sejam definitivamente incluídos na prática da aquicultura, como por exemplo: quais são os benefícios econômicos da melhora na saúde geral e intestinal dos peixes na piscicultura? Em termos financeiros, o maior custo na ração com a inclusão destas moléculas é vantajoso para o produtor? Isso irá garantir uma melhor conversão alimentar e maior sobrevivência dos animais submetidos aos desafios ambientais e inúmeros patógenos naturais na piscicultura? Atualmente, tem sido extremamente difícil aliar projetos de pesquisas deste porte em pisciculturas, pois é necessário o uso de sua infraestrutura, além do controle da preparação e manejo da dieta. A fim de auxiliar futuros estudos à campo, sugerimos que a inclusão de 250 mg/kg de *M. piperita* e de 125-250 mg/kg de *M. alternifolia* por 60 dias é suficiente para imunoestimular componentes da resposta humoral dos peixes, o que poderá trazer benefícios em sobrevivência e melhor resposta à vacinação. Além disso, a inclusão de 250 mg/kg de *M. alternifolia* por 60 dias aumenta a vilosidade intestinal, o que poderá trazer benefícios em parâmetros zootécnicos. Por último, a suplementação com 1% de OE de tomilho por 15 dias imunoestimula componentes celulares também sendo possível trazer benefícios na sobrevivência dos peixes de cultivo. Em termos práticos, a suplementação na concentração de 125 mg/kg representa 3,75 mg de OE/kg de peso

vivo dos peixes, na concentração de 250 mg/kg representa 7,5 mg de OE/kg de peso vivo dos peixes e na concentração de 1% representa 300 mg de OE/kg de peso vivo.


As pesquisas com OEs como aditivos alimentares nas dietas de peixes colaboram com o fortalecimento da piscicultura brasileira. O uso dessas substâncias pode reduzir a utilização de quimioterápicos e antibióticos na criação, culminando em maior biossegurança, bem como segurança alimentar para os consumidores. Acreditamos que as pesquisas que objetivam as análises dos efeitos no hospedeiro irão servir como base para garantir o sucesso da empregabilidade de tais substâncias.

## Capítulo 6 - Anexos

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 13019/15 do trabalho de pesquisa intitulado **“Efeito da suplementação dietária com fitoterápicos sobre a saúde intestinal e parâmetros zootécnicos de peixes”**, sob a responsabilidade da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Pilarski está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de agosto de 2015.

Jaboticabal, 07 de agosto de 2015.



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paola Castro Moraes**  
Coordenadora – CEUA

# Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia

Gustavo M. R. Valladão | Sílvia U. Gallani | Gabriela Pala | Raphael B. Jesus |  
Suzana Kotzent | Jaqueline C. Costa | Thiago F. A. Silva | Fabiana Pilarski 

Laboratory of Parasitology and Microbiology of Aquatic Organisms, School of Agricultural and Veterinarian Sciences, São Paulo State University (UNESP), Aquaculture Center of UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil

## Correspondence

Fabiana Pilarski, Laboratory of Parasitology and Microbiology of Aquatic Organisms, School of Agricultural and Veterinarian Sciences, São Paulo State University (UNESP), Aquaculture Center of UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil.  
Email: fabianap@caunesp.unesp.br

## Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2014/14039-9

## Abstract

The effect of the essential oils (EOs) of peppermint, *Mentha piperita* L., and tea tree, *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel, on the haematological, biochemical, and immunological parameters and intestinal morphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., was evaluated. Fish ( $58.09 \pm 5.87$  g) were fed 100 mg/kg and 250 mg/kg of each EO and sampled on days 7, 14, 30 and 60 after starting supplementation. The haematological and biochemical parameters were not altered by the supplementation of EOs compared to the control ( $p > .05$ ). With regard to the immunological parameters, the activation of the complement system of fish fed 250 mg/kg peppermint and 100 mg/kg and 250 mg/kg tea tree EOs were significantly higher compared to the control after 60 days of feeding ( $p < .05$ ). The complement system plays an essential role in innate immunity and contributes significantly to the acquired immune response; thus, its activation through supplementation with EOs is promising for the formulation of nutritional additives in aquaculture. Regarding intestinal morphology, fish fed 250 mg/kg tea tree EO presented higher villus size compared to all other groups ( $p < .05$ ), which represents a healthier gut. These fish present a larger intestinal surface, which can result in better absorption and utilization of the nutrients. Based on the responses found in this study, both EOs were considered promising for the formulation of feed additives for Nile tilapia.

## KEYWORDS

aquaculture, immunostimulant, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita*, phytotherapy, plant extract

## 1 | INTRODUCTION

Aquaculture intensification culminates in sanitary barriers that can affect production. Due to the emergence of diseases, fish farmers have made use of different chemicals and antibiotics, which may pose a risk to the aquatic environment and consumer health (Rico & Van den Brink, 2014). To overcome the problems associated with the use of such substances, researchers have been encouraged to find alternative and preventive solutions, based mainly on the use of feed additives (Encarnação, 2016). Among various feed additives,

herbal medicines have been highlighted by several authors for promoting beneficial effects on the haemato-immunological parameters and intestinal health of aquatic animals (Chakraborty & Hancz, 2011; Citarasu, 2010; Galina, Yin, Ardo & Jeney, 2009; Harikrishnan, Bala-sundaram & Heo, 2011; Reverter, Bontemps, Lecchini, Banaigs & Sasal, 2014).

Regarding the herbal medicines studied here, the tea tree, *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel, is known for its powerful antiseptic effect (Thomsen et al., 2011). Recently, the essential oil (EO) of the tea tree has been described to have

promising antiparasitic and bactericidal action against fish pathogens when used in water (Steverding, Morgan, Tkaczynski, Walder & Tinsley, 2005; Valladão et al., 2016). However, to the best of our knowledge, the use of tea tree EO in the diet and its effect on the general status of healthy fish and intestinal mucosa is unknown. Peppermint, *Mentha piperita* L., is known to have beneficial effects on gastrointestinal tissue, immunomodulating actions and chemopreventive potential (McKay & Blumberg, 2006). Recently, some authors have shown that peppermint EO has antiparasitic effect against *Ichthyophthirius multifiliis* (Valladão et al., 2016) and monogeneans (Costa et al., 2017; Hashimoto et al., 2016; Malheiros, Maciel, Videira & Tavares-Dias, 2016), and when used in water did not cause negative effects on fish haematology (Hashimoto et al., 2016). The enhancement of haematological and immune parameters was observed in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) (Adel, Pourgholam, Zorriehzahra & Ghiasi, 2016), and Caspian white fish, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii) (Adel, Amiri, Zorriehzahra, Nematollahi & Esteban, 2015), fed with ethanolic extract of peppermint, and in Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), fed with a powder of peppermint leaves (Talpur, 2014). Recently, Ribeiro et al. (2016) reported that the EO of this plant alters haematological and biochemical parameters of black pacu, *Colossoma macropomum* (Cuvier), when added to its diet. To the best of our knowledge, no results were found regarding the effect of peppermint on fish intestinal health.

Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., is one of the main species produced in captivity worldwide. Tilapia farming, however, faces significant health barriers, which culminate in mortality outbreaks. Some studies have addressed the use of different additives in the feed of Nile tilapia, aiming their beneficial effects towards the intestinal mucosa (Welker, Lim, Yildirim-Aksoy & Klesius, 2012) and the improvement of overall health (Ngamkala, Futami, Endo, Maita & Katagiri, 2010). Although tilapia stands out in aquaculture, the effects of EOs on its gut mucosa and health are little known.

This study explores the possible effects of supplementation with peppermint and tea tree EOs on the haematological, biochemical and immunological parameters and its influence on the intestinal morphology of Nile tilapia.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Fish and study design

Nile tilapia fingerlings were purchased from a commercial fish farm and kept in 500-L tanks with constant aeration and open water flow (200 L/hr) for acclimation for 2 months. During this period, no signs of disease or abnormal behaviour were observed. Four hundred fish ( $58.09 \pm 5.87$  g) were distributed randomly and equally (20 fish per tank) in 20 tanks (500 L), which were randomly divided into five groups, with one being the group control, two groups supplemented with peppermint EO (100 and 250 mg/kg) and two groups supplemented with tea tree EO (100 and 250 mg/kg), each with four replicates.

The source of water was the same for all tanks. The temperature, pH and dissolved oxygen were measured weekly in all groups using pH 100 and YSI 55 probes. All parameters were appropriate for fish maintenance and did not differ between groups (Table 1).

All experimental procedures were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee (CEBEA) of the School of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil, under protocol number 13019/15. The approval was consistent with the ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

### 2.2 | Herbal medicines and diet

Pure EOs of tea tree and peppermint were purchased from Phytoterapica<sup>®</sup> (São Paulo, Brazil). Both herbal medicines were subjected to gas chromatography (GC) (Agilent 7820A) for the identification and evaluation of their constituents. Separations were carried out in Agilent-fused silica capillary HP-5 columns (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm). The temperature of the CG injector was maintained at 200°C. The column temperature program was as follows: an initial 50°C and then an increase of 3°C/min to 200°C.

The base diet for the whole experimental period was a commercial feed (Trouw Nutrition<sup>®</sup>, Brazil) specific for omnivorous fish. The guaranteed levels of commercial feed used in the study were as follows: 120 g/kg moisture (max), 320 g/kg crude protein (min), 45 g/kg ether extract (min), 120 g/kg mineral matter (max), 90 g/kg fibrous matter (max), 10–35 g/kg calcium (min–max), 6 g/kg phosphorus (min), 1.5 g/kg sodium (min), 25 mg/kg magnesium (min), 14.4 g/kg lysine (min), 4.8 g/kg methionine (min), 80 mg/kg zinc (min), 20 mg/kg copper (min), 35 mg/kg iron (min), 50 mg/kg manganese (min), 0.48 mg/kg cobalt (min), 1 mg/kg iodine (min), 0.2 mg/kg selenium (min), 348 mg/kg choline (min), 4.8 mg/kg folic acid (min), 100 mg/kg niacin (min), 0.5 mg/kg biotin (min) and 32 mg/kg pantothenic acid (min).

Each dose (100 mg/kg and 250 mg/kg) of EOs was weighed on a precision scale, mixed in soya bean oil (4% of the diet) and spread in the base diet. The mixture in soya bean oil was chosen as it is the practically applied substance used by fish farmers to administer

**TABLE 1** Water parameters of fish in the control group and the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*)

Group	Temperature (°C)	Dissolved oxygen (mg/L)	pH
Control	29.22 ± 0.50	4.87 ± 0.61	7.49 ± 0.15
Peppermint (100 mg/kg)	29.58 ± 0.25	5.03 ± 0.43	7.51 ± 0.15
Peppermint (250 mg/kg)	29.38 ± 0.49	5.16 ± 0.36	7.47 ± 0.11
Tea tree (100 mg/kg)	29.38 ± 0.57	4.88 ± 0.27	7.47 ± 0.12
Tea tree (250 mg/kg)	29.32 ± 0.35	5.03 ± 0.39	7.50 ± 0.14

dietary additives and antibiotics. The control group received the base diet with the addition of 4% soya bean oil using the same method. The diets were prepared daily, and the fish were fed 3% of their body weight twice daily for 60 days.

## 2.3 | Blood parameters

On days 7, 14, 30 and 60 after the beginning of feeding, three fish per tank (12 per treatment) were collected for the analysis of blood parameters. The fish were anaesthetized with a benzocaine solution (100 mg/L), and blood was collected from the caudal vessel using sterile syringes.

### 2.3.1 | Haematological parameters

For the preparation of blood smears, a drop of whole blood from each sample was used. To count and differentiate leucocytes, the slides were stained using the Rosenfeld (1947) method. The total count provided data of leucocytes and thrombocytes by counting 2,000 red blood cells. For the differential count, 200 white blood cells were counted (including lymphocytes, monocytes, neutrophils and eosinophils).

A portion of the blood was heparinized (5,000 U.I.) to perform the total count of red blood cells (RBCs) and for the analysis of the respiratory burst activity of leucocytes. For RBCs, each sample was stored in a formol citrate solution (1:200) using the method of Hesser (1960), and the values are expressed in  $10^6$  cells/mm<sup>3</sup>.

The remaining blood (approximately 1.5 ml) was left to clot for 2 hr at room temperature and centrifuged at 1,008 g for 10 min (4°C). Individual serum was used to conduct biochemical and immunological analyses.

### 2.3.2 | Biochemical parameters

The values of serum total protein and albumin of the animals were assessed using Labtest® kits (references 99-250 and 19-1/250, respectively) and measured in a spectrophotometer (Unico 2100 Spectrophotometer) according to the manufacturer's instructions. The globulin data were calculated by subtracting the amount of albumin from the total protein. The results are expressed in g/dl.

The analyses of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were performed using Labtest® kits (references 108 and 109, respectively) in a UV/VIS spectrophotometer (Genesys 10S) according to the manufacturer's instructions, and the values are expressed in UI/L.

### 2.3.3 | Immunological parameters

The respiratory burst activity of leucocytes was performed as described by Biller-Takahashi, Takahashi, Saita, Gimbo and Urbinati (2013), which is based on the reduction of nitroblue tetrazolium to formazan granules, and was measured in a spectrophotometer

(UNICO 2100 Spectrophotometer). The results are expressed as the optical density (OD).

Serum lysozyme concentrations were measured in an ELISA reader (Thermoplate reader MN) according to the methodology described by Ellis (1990) based on the lysis of *Micrococcus lysoideikticus*. The values are expressed in ng/μl.

The complement system (alternative pathway) activity (ACH50) of fish was estimated using the protocol described by Zanuzzo et al. (2015), where each sample was measured as the time (min) required for the initial OD to be reduced by half (indicating 50% lysis of rabbit red blood cells by the activation of the complement system).

## 2.4 | Intestinal morphology

Three fish from each tank (12 per treatment) were collected on days 7, 14, 30 and 60 to evaluate the intestinal morphology. After blood sampling, the animals were euthanized by deepening the anaesthetic plan for the collection of the intestine. At necropsy, approximately 2 cm of the midgut was excised, opened with a longitudinal section and fixed in Bouin solution for 20 hr. Subsequently, the material was maintained in 70% alcohol until histological processing. All samples were subjected to the conventional histological technique and embedded in paraffin. Histological slides were stained with periodic acid-Schiff (PAS).

Photomicrographs of the slides were processed under a NIKON E200® microscope (Nikon) equipped with Motic 2300 capture system (Quimis) and measured using Image ProPlus® software (Media Cybernetics Inc.). Photomicrographs with a magnification of 100x were used to measure the length and thickness of the villi, while photomicrographs at a magnification of 400x were used for the quantification of goblet cells and intraepithelial lymphocytes (IELs) using a grid with a systematic set of random windows of known area (Gundersen, 1977). The data from cell counts were arranged by the number of cells per 100 enterocytes.

## 2.5 | Statistical analysis

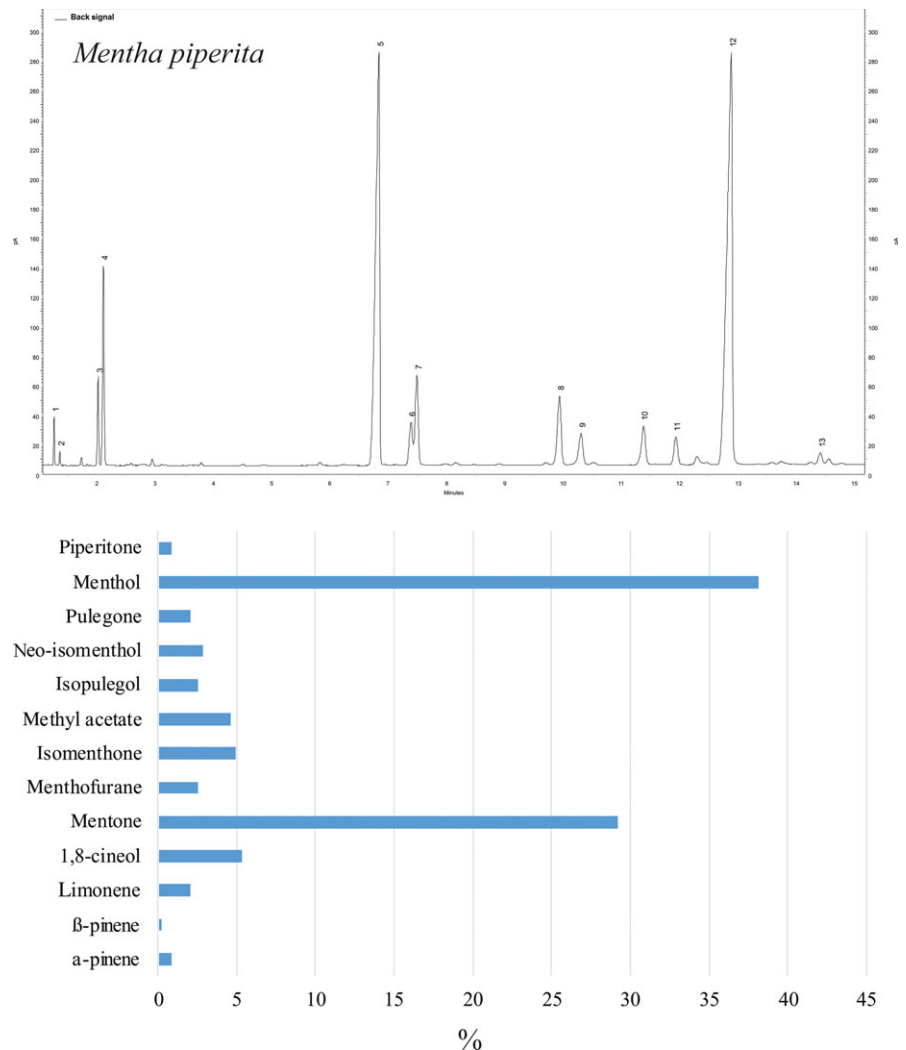
All values are expressed as the mean ± standard deviation and analysed by SigmaStat (version 3.5) software (Systat Software). All parameters were analysed using a one-way ANOVA. The significant results ( $p < .05$ ) from dependent variables were tested with the Tukey multicomparison test of means using a significance level of 0.05. Rare non-normal data were normalized using the square root transformation.

# 3 | RESULTS

## 3.1 | Essential oils

Mentone (29.2%) and menthol (38.1%) were the major components of peppermint EO (Figure 1), while terpinen-4-ol (46.8%) and  $\gamma$ -terpinene (15.3%) were the major components of the EO of tea tree (Figure 2).





**FIGURE 1** Chromatogram and chemical constituents of the essential oil of peppermint (*Mentha piperita*). [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

### 3.2 | Haematological parameters

The inclusion of peppermint and tea tree at concentrations of 100 and 250 mg/kg did not affect the haematological parameters of Nile tilapia, which were statistically similar ( $p > .05$ ) to the control until day 60 after the beginning of the feeding (Tables 2, 3 and 4). The RBCs on day 14 were lost, making it impossible to calculate some haematological parameters in this sample.

### 3.3 | Biochemical parameters

The total protein, albumin and globulin parameters were not altered with the use of the EOs compared to the control ( $p > .05$ ) (Figure 3). Liver enzymes ALT and AST were not altered with the use of EOs compared to the control ( $p > .05$ ), indicating that the fish did not suffer liver damage when receiving the supplemented diets (Figure 3).

### 3.4 | Immunological parameters

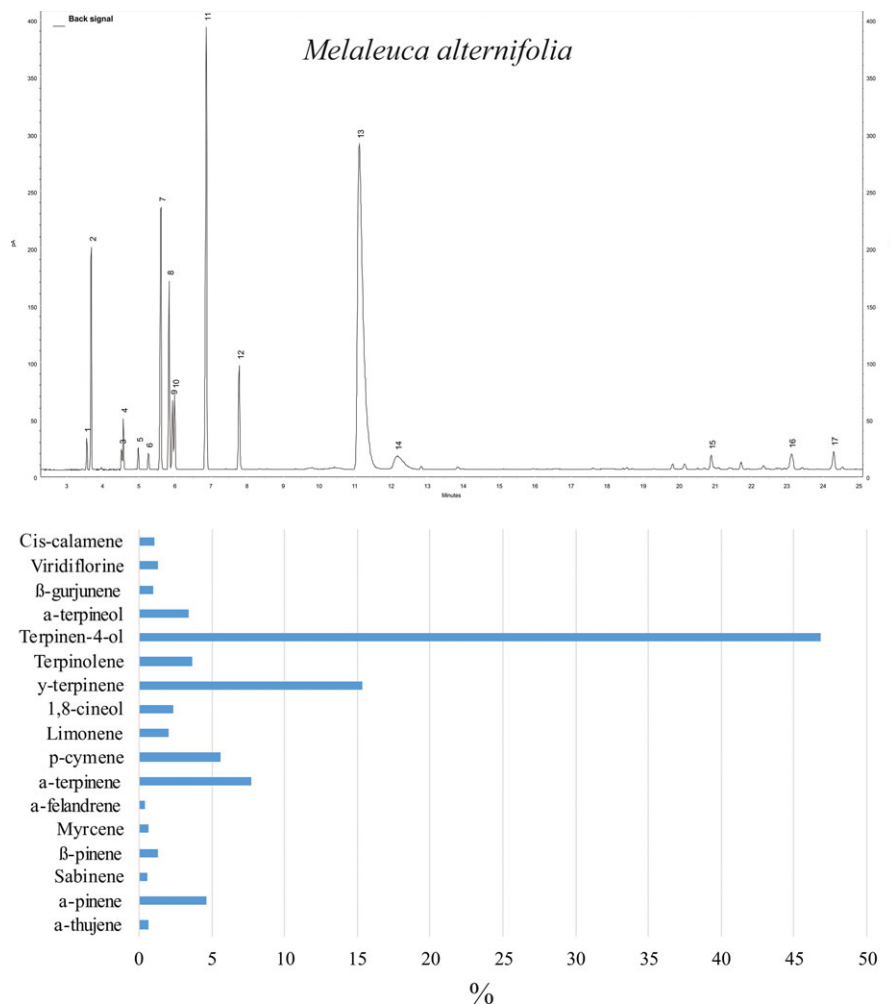
The lysozyme and the burst activities did not change with the use of tea tree or peppermint compared to the control (Figure 4). The ACH50, however, was enhanced in the groups that received

250 mg/kg peppermint and 100 mg/kg and 250 mg/kg tea tree compared to control after 60 days of feeding since the time (in minutes) to cause 50% haemolysis of rabbit blood cells was significantly lower ( $p < .05$ ) (Figure 4).

### 3.5 | Intestinal morphology

Regarding the intestinal measurements, the length of villi was not altered using EOs for up to 30 days of feeding ( $p > .05$ ). However, after 60 days of feeding, fish fed a diet containing tea tree (250 mg/kg) had significantly higher villi length compared to the other groups ( $p < .05$ ) (Table 5). Figure 5 illustrates the difference in villi length of the fish in the control group and in the group fed with 250 mg/kg tea tree.

Regarding the quantification of intestinal cells, the number of goblet cells was not altered with supplementation of up to 250 mg/kg tea tree and peppermint for up to 60 days ( $p > .05$ ) (Table 6). Fish fed diets containing higher levels (250 mg/kg) of both herbal medicines tended to have an increased number of IELs on days 14 and 60 (Table 6). However, the two inclusion levels were not sufficient to observe a significant difference ( $p > .05$ ) in this parameter (Table 6).



**FIGURE 2** Chromatogram and chemical constituents of the essential oil of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

**TABLE 2** Haematological parameters of fish in the control group and the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*) after 7 days of feeding

Blood cells	Day 7					p value
	Control	Peppermint		Tea tree		
		100 mg/kg	250 mg/kg	100 mg/kg	250 mg/kg	
Erythrocytes ( $\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ )	1.48 ± 0.31	1.68 ± 0.23	1.66 ± 0.47	1.38 ± 0.15	1.45 ± 0.24	.553
Thrombocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	14.37 ± 8.92	17.5 ± 6.83	18.26 ± 7.8	11.64 ± 5.56	10.58 ± 2.51	.419
Leucocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	24.19 ± 10.44	27.25 ± 7.2	32.25 ± 16.04	21.0 ± 6.32	21.02 ± 6.69	.491
Lymphocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	20.9 ± 10.54	25.24 ± 6.83	30.47 ± 16.13	18.60 ± 6.18	18.68 ± 6.5	.422
Monocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	2.01 ± 0.22	1.35 ± 0.3	1.23 ± 0.46	1.75 ± 0.35	1.48 ± 0.51	.070
Neutrophils ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	1.22 ± 0.43	0.73 ± 0.25	0.74 ± 0.08	0.83 ± 0.3	0.81 ± 0.54	.444
Basophils ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	0.03 ± 0.07	0.03 ± 0.04	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01	.790
Eosinophils ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	0.05 ± 0.07	0.02 ± 0.04	0.05 ± 0.06	0.05 ± 0.03	0.02 ± 0.03	.813

## 4 | DISCUSSION

All diets containing the EOs were considered safe for the fish in this study because the animals were fed normally, showed no behavioural changes and did not undergo negative haematological alterations, and

the result of the ALT and AST enzyme tests indicated no liver damage. Furthermore, this study revealed that EOs had beneficial effects on the complement system and on intestinal morphology.

According to different review articles (Chakraborty & Hancz, 2011; Citarasu, 2010; Galina et al., 2009; Harikrishnan et al., 2011;

**TABLE 3** Haematological parameters of fish in the control group and the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*) after 30 days of feeding

Blood cells	Day 30					p value
	Control	Peppermint		Tea tree		
		100 mg/kg	250 mg/kg	100 mg/kg	250 mg/kg	
Erythrocytes ( $\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ )	1.65 $\pm$ 0.14	1.39 $\pm$ 0.13	1.74 $\pm$ 0.29	1.72 $\pm$ 0.23	1.87 $\pm$ 0.29	.089
Thrombocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	26.57 $\pm$ 4.32	19.05 $\pm$ 2.71	20.08 $\pm$ 6.05	29.30 $\pm$ 9.85	23.75 $\pm$ 6.94	.184
Leucocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	43.54 $\pm$ 9.36	39.67 $\pm$ 16.65	38.35 $\pm$ 4.88	50.46 $\pm$ 5.25	58.19 $\pm$ 15.70	.129
Lymphocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	39.20 $\pm$ 7.90	33.39 $\pm$ 18.38	33.95 $\pm$ 4.79	42.04 $\pm$ 7.08	50.67 $\pm$ 12.26	.203
Monocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	1.96 $\pm$ 0.52ab	1.24 $\pm$ 0.37b	2.62 $\pm$ 1.19ab	2.91 $\pm$ 1.54ab	3.80 $\pm$ 1.30a	.045
Neutrophils ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	2.20 $\pm$ 1.22	1.38 $\pm$ 0.24	1.76 $\pm$ 0.77	3.26 $\pm$ 1.05	5.04 $\pm$ 3.43	.059
Basophils ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	0.08 $\pm$ 0.11	0.09 $\pm$ 0.14	0.02 $\pm$ 0.04	0.02 $\pm$ 0.04	0.04 $\pm$ 0.07	.675
Eosinophils ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	0.10 $\pm$ 0.19	0.02 $\pm$ 0.04	0.00 $\pm$ 0.00	0.16 $\pm$ 0.15	0.02 $\pm$ 0.04	.286

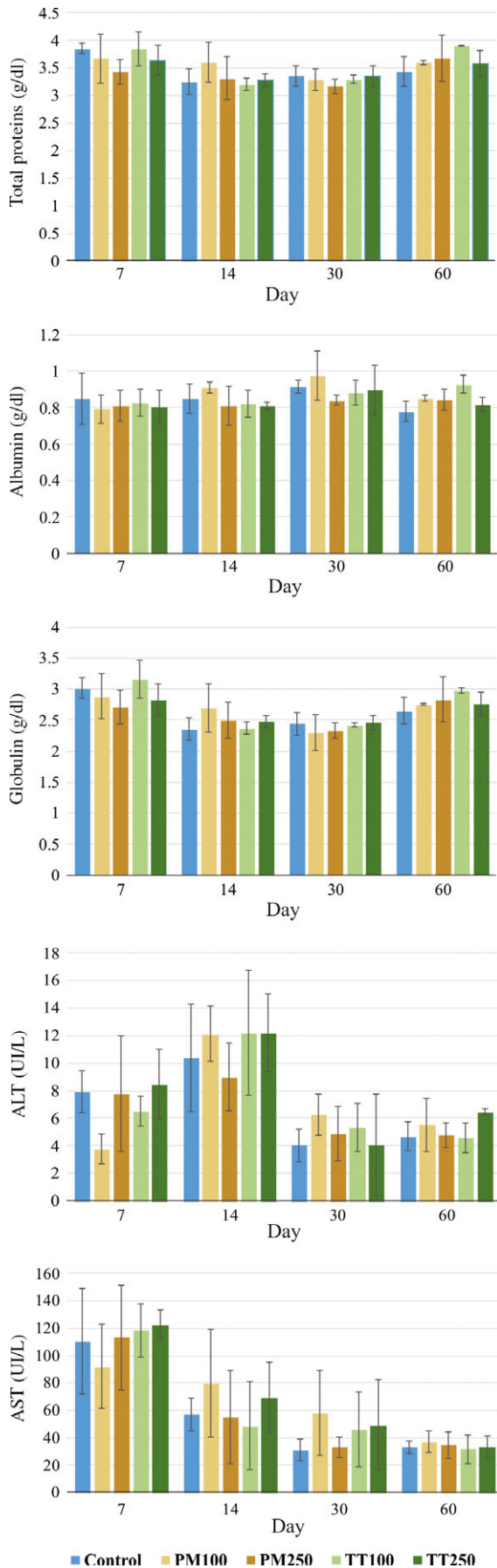
**TABLE 4** Haematological parameters of fish in the control group and the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*) after 60 days of feeding

Blood cells	Day 60					p value
	Control	Peppermint		Tea tree		
		100 mg/kg	250 mg/kg	100 mg/kg	250 mg/kg	
Erythrocytes ( $\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ )	2.02 $\pm$ 0.06	1.96 $\pm$ 0.22	1.86 $\pm$ 0.19	2.11 $\pm$ 0.23	1.93 $\pm$ 0.15	.565
Thrombocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	34.47 $\pm$ 3.6	36.77 $\pm$ 6.74	31.77 $\pm$ 3.8	38.32 $\pm$ 9.73	33.49 $\pm$ 7.13	.778
Leucocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	83.1 $\pm$ 14	85.97 $\pm$ 10.87	69.33 $\pm$ 7.29	82.34 $\pm$ 17.69	86.89 $\pm$ 2.25	.370
Lymphocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	72.52 $\pm$ 15.53	78.3 $\pm$ 13.79	56.92 $\pm$ 13.02	69.55 $\pm$ 7.89	71.7 $\pm$ 7.91	.413
Monocytes ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	7.7 $\pm$ 4.31	4.55 $\pm$ 1.77	6.21 $\pm$ 5.2	9.28 $\pm$ 8.58	6.96 $\pm$ 2.5	.880
Neutrophils ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	6.1 $\pm$ 2.65	2.85 $\pm$ 1.02	3.66 $\pm$ 1.76	4.86 $\pm$ 3.5	7.87 $\pm$ 3.7	.322
Basophils ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	0.1 $\pm$ 0.08	0.1 $\pm$ 0.03	0 $\pm$ 0	0.07 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.02	.07
Eosinophils ( $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	0.14 $\pm$ 0.13	0.09 $\pm$ 0.05	0.1 $\pm$ 0.17	0.11 $\pm$ 0.15	0.24 $\pm$ 0.08	.615

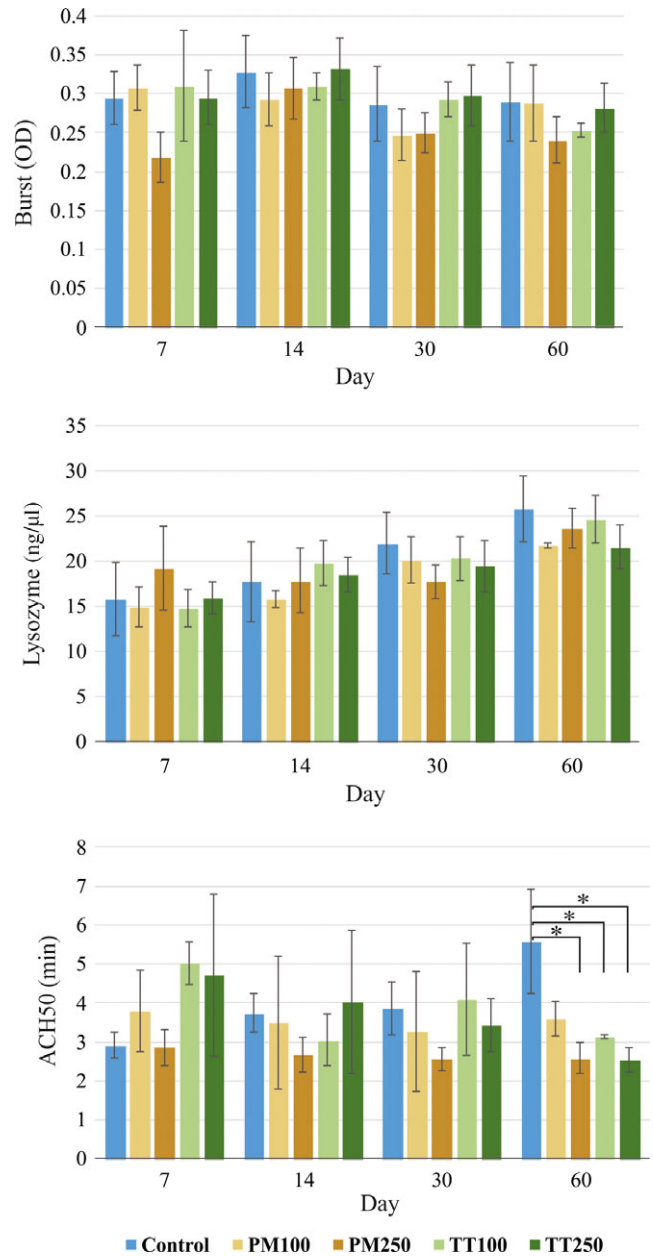
Reverter et al., 2014), some authors have highlighted the beneficial effects of different herbal medicines (extracts and powder) on fish blood cells; however, there are few studies that show that EOs also beneficially affect these parameters. The use of peppermint and tea tree EOs (100 and 250 mg/kg) did not alter the haematological parameters of Nile tilapia in this study, and a similar result was found by Saccol et al. (2013), who fed silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), with 0.25 to 2 ml/kg *Lippia alba* EO for 60 days. EO studies have increased in recent years, and recently, it is understood that supplementation with EOs only at concentrations above 1 g/kg for approximately 60 days cause changes in the haematological parameters of tilapia (Acar, Kesbiç, Yılmaz, Gültepe & Türker, 2015; Baba, Acar, Öntaş, Kesbiç & Yılmaz, 2016; Brum et al., 2017). Based on these recent results, it appears that there is a need for large amounts of EOs in the feed to result in an effect on the blood cells of fish. For the serum biochemical parameters (total proteins and albumin), it is partially the same. The total amount of protein increased, but albumin was not altered even with high doses of EOs (Acar et al., 2015; Baba et al., 2016). Under the conditions tested here, these parameters were not changed.

Regarding the immunological parameters evaluated, the activity of the complement system was increased with the use of peppermint and tea tree EOs. The complement system is essential for the innate immune system of the fish and is most well known for its capacity to kill pathogens by creating pores in their surface membranes or by opsonizing pathogens by stimulating phagocytosis (Holland & Lambris, 2002). In addition, complement system activation contributes significantly to fish immunity by enhancing the adaptive immune response (Boshra, Li & Sunyer, 2006; Holland & Lambris, 2002). The rapid activation of the complement system in fish fed for 60 days with peppermint and tea tree EOs reveals that these herbal medicines have great potential to be used as an immunostimulant for fish. Knowing the role of the complement system in animal health, fish fed diets containing these herbal products may present better responses to the natural exposures to pathogens in the culture environment or present better responses to immunization with vaccines. These are some characteristics that deserve to be evaluated and validated under field conditions.

The use of these EOs also positively influences features of gut morphology. It is known that the intestine plays an important role



**FIGURE 3** Biochemical parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed with a control diet, 100 mg/kg peppermint (*Mentha piperita*) (PM100), 250 mg/kg peppermint (*Mentha piperita*) (PM250), 100 mg/kg tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (TT100) and 250 mg/kg tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (TT250) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



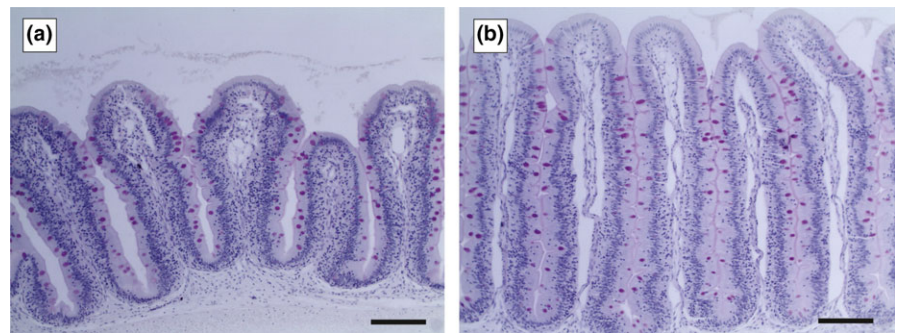
**FIGURE 4** Immunological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed with a control diet, 100 mg/kg peppermint (*Mentha piperita*) (PM100), 250 mg/kg peppermint (*Mentha piperita*) (PM250), 100 mg/kg tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (TT100) and 250 mg/kg tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (TT250). \* Indicates significant difference ( $p < .05$ ) between control and treated groups. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

in the productivity of animals because it acts directly on the digestion and assimilation of nutrients, but it also has a relevant function in the immune system, as described by Nicholson et al.

**TABLE 5** Measurement of intestinal parameters of fish of the control group and of the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*) EOs

Villi measures ( $\mu\text{m}$ )	Day	Control	Peppermint		Tea tree		p value
			100 mg/kg	250 mg/kg	100 mg/kg	250 mg/kg	
Length	7	309.99 $\pm$ 51.78	340.60 $\pm$ 27.11	302.98 $\pm$ 57.17	333.35 $\pm$ 14.69	308.06 $\pm$ 19.77	.558
	14	378.07 $\pm$ 24.44	383.13 $\pm$ 16.89	383.28 $\pm$ 22.01	363.13 $\pm$ 43.80	398.76 $\pm$ 45.73	.664
	30	321.13 $\pm$ 68.50	418.11 $\pm$ 45.52	398.72 $\pm$ 92.26	384.04 $\pm$ 65.42	400.07 $\pm$ 27.76	.289
	60	421.35 $\pm$ 23.32b	446.40 $\pm$ 60.87b	401.79 $\pm$ 28.97b	459.79 $\pm$ 52.72b	540.52 $\pm$ 22.35a	.020
Thickness	7	136.51 $\pm$ 14.44	138.20 $\pm$ 12.76	152.69 $\pm$ 5.69	146.48 $\pm$ 5.34	138.60 $\pm$ 8.21	.164
	14	139.82 $\pm$ 4.06	138.33 $\pm$ 9.80	151.34 $\pm$ 8.92	147.75 $\pm$ 11.04	145.30 $\pm$ 6.65	.214
	30	120.06 $\pm$ 16.96	156.82 $\pm$ 26.95	144.77 $\pm$ 26.25	131.04 $\pm$ 14.12	144.17 $\pm$ 13.17	.159
	60	150.29 $\pm$ 8.04	163.81 $\pm$ 6.78	157.73 $\pm$ 13.12	158.29 $\pm$ 14.76	157.73 $\pm$ 3.12	.586

Different letters indicate significant differences between the means of the treatments.

**FIGURE 5** Visual comparison between the intestinal villi of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, of the control group (a) and the group fed with 250 mg/kg tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (b). Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]**TABLE 6** Quantification of intestinal cells of fish of the control group and of the groups supplemented with peppermint (*Mentha piperita*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*) EOs

Intestinal cells (per 100 enterocytes)	Day	Control	Peppermint		Tea tree		p value
			100 mg/kg	250 mg/kg	100 mg/kg	250 mg/kg	
Goblet cells	7	5.10 $\pm$ 2.09	5.27 $\pm$ 3.04	5.26 $\pm$ 0.31	6.51 $\pm$ 1.94	5.88 $\pm$ 2.29	.895
	14	5.22 $\pm$ 0.99	4.01 $\pm$ 1.66	3.90 $\pm$ 1.40	4.63 $\pm$ 0.69	6.75 $\pm$ 1.76	.060
	30	7.92 $\pm$ 0.67	8.85 $\pm$ 3.80	8.31 $\pm$ 2.61	8.83 $\pm$ 1.94	8.56 $\pm$ 2.85	.986
	60	8.58 $\pm$ 2.48	7.21 $\pm$ 1.14	9.21 $\pm$ 1.10	8.58 $\pm$ 1.19	10.81 $\pm$ 3.39	.252
Intraepithelial lymphocytes	7	53.14 $\pm$ 7.08	54.09 $\pm$ 7.45	61.45 $\pm$ 6.26	50.78 $\pm$ 15.55	50.90 $\pm$ 14.73	.648
	14	46.74 $\pm$ 4.05	46.20 $\pm$ 6.86	58.54 $\pm$ 4.02	50.36 $\pm$ 8.23	56.10 $\pm$ 2.88	.051
	30	62.60 $\pm$ 1.43	53.01 $\pm$ 12.48	53.89 $\pm$ 12.87	50.76 $\pm$ 16.36	57.75 $\pm$ 9.28	.643
	60	37.21 $\pm$ 6.59	37.28 $\pm$ 1.60	56.68 $\pm$ 12.89	55.85 $\pm$ 18.01	50.50 $\pm$ 9.42	.09

(2012). Many infectious diseases are initiated by colonization of the intestinal mucosa, and the efficiency of the intestinal barrier depends on the production of mucus and epithelial integrity to prevent the onset of disease. The increase in the length of the villi of fish fed with EOs reveals another benefit of using these molecules as a supplement for fish feeding because long villi are usually equated with excellent gut health, high absorption efficiency and healthier intestinal tracts of animals (Mohamed, El-Daly, El-Azeem, Youssef & Hassan, 2014).

It is possible to conclude that both peppermint and tea tree EOs have potential for use as an additive in fish feed, showing benefits in intestinal health and on immune parameters, even at low doses of supplementation, which can guarantee inclusion in the diet at a low cost. Based on these results, other secondary benefits, such as improved feed conversion, increased weight gain, and increased resistance to environmental stress, parasites and bacteria, should be evaluated under culture conditions to evaluate the cost and benefit of using these molecules.



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for a scholarship (grant number: 2014/14039-9). The authors declare no conflict of interests.

## REFERENCES

- Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., 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., Amiri, A. A., Zorriehzahra, J., Nematollahi, A., & Esteban, M. Á. (2015). Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 841–847.
- 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 Immunology*, 55, 267–273.
- Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O. S., & 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.
- Biller-Takahashi, J. D., Takahashi, L. S., Saita, M. V., Gimbo, R. Y., & Urbinati, E. C. (2013). Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, 73(2), 425–429.
- Boshra, H., Li, J., & Sunyer, J. O. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 239–262.
- Brum, A., Pereira, S. A., Owatari, M. S., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mourão, J. L. P., & Martins, M. L. (2017). Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 468, 235–243.
- Chakraborty, S. B., & Hancz, C. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture*, 3(3), 103–119.
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3), 403–414.
- Costa, J. C., Valladão, G. M. R., Pala, G., Gallani, S. U., Kotzent, S., Crotti, A. E. M., ... Pilarski, F. (2017). *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*, 471, 72–79.
- Ellis, A. E. (1990). Lysozyme Assays. In T. I. F. Immunology (Ed.), *Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, Muiswinkel WB*, 220. California: Sos Publications.
- Encarnação, P. (2016). Functional feed additives in aquaculture feeds. In: *Aquafeed formulation* (ed. by S. F. Nates), pp. 217–236. Elsevier, Amsterdam.
- Galina, J., Yin, G., Ardo, L., & Jeney, Z. (2009). The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4), 669–676.
- Gundersen, H. J. G. (1977). Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: The edge effect. *Journal of Microscopy*, 111(2), 219–223.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1), 1–15.
- Hashimoto, G. S. O., Neto, F. M., Ruiz, M. L., Acchile, M., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Martins, M. L. (2016). Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture*, 450, 182–186.
- Hesser, E. F. (1960). Methods for routine on fish hematology. *The Progressive Fish Culturist*, 22, 164–171.
- Holland, M. C. H., & Lambris, J. D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 12(5), 399–420.
- Malheiros, D. F., Maciel, P. O., Videira, M. N., & Tavares-Dias, M. (2016). Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture*, 455, 81–86.
- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20(8), 619–633.
- Mohamed, M. A., El-Daly, E. F., El-Azeem, N. A. A., Youssef, A. W., & Hassan, H. M. A. (2014). Growth performance and histological changes in ileum and immune related organs of broilers fed organic acids or antibiotic growth promoter. *International Journal of Poultry Science*, 13(10), 602–610.
- Ngamkala, S., Futami, K., Endo, M., Maita, M., & Katagiri, T. (2010). Immunological effects of glucan and *Lactobacillus rhamnosus* GG, a probiotic bacterium, on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* intestine with oral *Aeromonas* challenges. *Fisheries Science*, 76(5), 833–840.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), 1262–1267.
- 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.
- Ribeiro, S. C., Castelo, A. S., Silva, B. M. P. D., Cunha, A. D. S., Proietti-Junior, A. A., & Oba-Yoshioka, E. T. (2016). Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serranalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Acta Amazonica*, 46(1), 99–106.
- Rico, A., & Van den Brink, P. J. (2014). Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. *Science of the Total Environment*, 468, 630–641.
- Rosenfeld, G. (1947). Corante pancreático para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, 20, 329–334.
- Saccol, E. M., Uczay, J., Pês, T. S., Finamor, I. A., Ourique, G. M., Riffel, A. P., ... Pavanato, M. A. (2013). Addition of *Lippia alba* (Mill) NE Brown essential oil to the diet of the silver catfish: An analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. *Aquaculture*, 416, 244–254.
- Steverding, D., Morgan, E., Tkaczynski, P., Walder, F., & Tinsley, R. (2005). Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp. infection of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66(1), 29–32.
- Talpur, A. D. (2014). *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*, 420, 71–78.
- Thomsen, P. S., Jensen, T. M., Hammer, K. A., Carson, C. F., Mølgaard, P., & Riley, T. V. (2011). Survey of the antimicrobial activity of commercially available Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil products in vitro. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 17(9), 835–841.

- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Ikefuti, C. V., Cruz, C., Levy-Pereira, N., Rodrigues, M. V. N., & Pilarski, F. (2016). Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): Special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Fish Diseases*, 39(10), 1143–1152.
- Welker, T. L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., & Klesius, P. H. (2012). Use of Diet Crossover to Determine the Effects of beta-glucan Supplementation on Immunity and Growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of The World Aquaculture Society*, 76(5), 833–840.
- Zanuzzo, F. S., Urbinati, E. C., Rise, M. L., Hall, J. R., Nash, G. W., & Gamperl, A. K. (2015). *Aeromonas salmonicida* induced immune gene

expression in *Aloe vera* fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, 435, 1–9.

**How to cite this article:** Valladão GMR, Gallani SU, Pala G, et al. Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquac Res.* 2017;48:5640–5649.

<https://doi.org/10.1111/are.13386>



# ATIVIDADE IN VITRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA BACTÉRIAS INTESTINAIS DE PEIXES

## *IN VITRO ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST INTESTINAL FISH BACTERIA*

**Sílvia Umeda Gallani<sup>(1)</sup>;**  
**Gustavo Moraes Ramos Valladão<sup>(2)</sup>;**  
**Kátia Suemi Gozi<sup>(3)</sup>;**  
**Suzana Kotzent<sup>(4)</sup>;**  
**Thiago Fernandes Alves da Silva<sup>(5)</sup>;**  
**Fabiana Pilarski<sup>(6)</sup>.**

### Resumo

O surto de doenças é considerado o principal fator limitante na aquicultura. O uso de fitoterápicos como método alternativo para o tratamento dessas doenças tem sido ressaltado por diversos pesquisadores, já que são compostos potentes, naturais e biodegradáveis, podendo ser utilizados na ração ou via banho. Os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* possuem diversas funções, mas se destacam, principalmente, pela ação antimicrobiana. Neste estudo, foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) destes óleos para bactérias encontradas no intestino de peixes: *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* e *Edwardsiella tarda*. As bactérias (previamente identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA) foram plaqueadas em ágar Mueller-Hinton (29°C por 24 horas) para a obtenção de colônias isoladas. As colônias foram adicionadas em meio líquido Muller-Hinton até atingir a concentração inicial teste de 10<sup>8</sup> UFC/ml em leitura no espectrofotômetro (valores entre 0,08 e 0,130 em 625 nm). Para a microtitulação, primeiramente foi pipetado 150 µl do meio líquido em todos os poços. Em seguida, foi feita adição de 150 µl das soluções fitoterápicas em triplicata (400 µl do fitoterápico solubilizado em 800 µl de dimetilsulfóxido, adicionado em 8,8 ml de meio líquido) na primeira fileira de poços (concentração mais alta). A partir da primeira fileira de

<sup>1</sup> Doutoranda em aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp, médica veterinária. Endereço eletrônico: sigallani@hotmail.com  
Telefone: (16) 3209-7477

<sup>2</sup> Doutorando em aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp, médico veterinário. Endereço eletrônico: gmrvalladao@gmail.com  
Telefone: (16) 3209-7477

<sup>3</sup> Mestranda em aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp, médica veterinária. Endereço eletrônico: ksg.sjrp@hotmail.com  
Telefone: (16) 3209-7477

<sup>4</sup> Mestranda em microbiologia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp, bióloga. Endereço eletrônico: su\_kotzent@hotmail.com  
Telefone: (16) 3209-7477

<sup>5</sup> Doutorando em aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp, engenheiro de pesca. Endereço eletrônico: thg\_silva@hotmail.com  
Telefone: (16) 3209-7477

<sup>6</sup> Pesquisadora pelo Centro de Aquicultura da Unesp, bióloga. Endereço eletrônico: fabianap@caunesp.unesp.br  
Telefone: (16) 3209-7477





poços, foi realizada a diluição seriada para o teste de oito concentrações de cada fitoterápico. As concentrações foram de 1,5; 0,75; 0,375; 0,188; 0,094; 0,047; 0,023 e 0,012 (% v/v). Posteriormente, 50 ul da solução bacteriana foi adicionada em cada poço. O teste foi realizado com três grupos controles: meio líquido, meio líquido com solução fitoterápica e outro de meio líquido com bactéria. Após 24 h de crescimento em 29°C, o corante cloreto de trifeniltetrazólio foi adicionado para avaliar macroscopicamente o crescimento bacteriano nos poços. Os valores de CMI foram determinados pela primeira concentração que não coloriu. Os valores de CMB foram determinados pelo plaqueamento das concentrações em meio ágar Muller-Hinton. Para *A. hydrophila*, o CMI e CMB da *M. alternifolia* e da *M. piperita* foram iguais a 1,5% v/v. Para *S. aureus* o CMI e CMB de ambos fitoterápicos foi maior que 1,5% v/v. Já contra *E. tarda*, *M. alternifolia* apresentou MIC 0,75% v/v e CMB 1,5% v/v e *M. piperita* CMI de 1,5% v/v e CMB maior que 1,5% v/v. Ambos óleos apresentaram potencial atividade antimicrobiana para utilização *in vivo*.



# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITRONELA E MANJERICÃO

## *ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF CITRONELLA AND BASIL*

**Thiago F. A. Silva**<sup>(1)</sup>  
**Suzana Kotzent**<sup>(2)</sup>  
**Silvia U. Gallani**<sup>(3)</sup>  
**Gustavo R. M. Valladão**<sup>(4)</sup>  
**Katia S. Gozi**<sup>(5)</sup>  
**Fabiana Pilarski**<sup>(6)</sup>

### **Resumo**

#### **Resumo**

A ocorrência de bacterioses na aquicultura tem sido um grande entrave na produção. O limitado número de agentes antimicrobianos e problemas ambientais causados pelo uso inadequado dos fármacos existentes dificultam o tratamento e eliminação dos patógenos. Por isto, um grande esforço tem sido feito em busca de agentes antimicrobianos ambientalmente seguros. O presente estudo avaliou a capacidade inibitória do óleo essencial de Citronela (*Cymbopogon winterianus*) e Manjericão (*Ocimum basilicum*) frente aos patógenos, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* e *Staphylococcus aureus*. As estirpes bacterianas foram previamente identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA. A susceptibilidade bacteriana foi determinada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando o método de diluição em microplacas com 96 poços. Para tanto, 150 µl do meio de cultura caldo Muller-Hinton foi adicionado em todos os poços. Em seguida, foi adicionado ao primeiro poço 150 µl da solução matriz contendo fitoterápico solubilizado em dimetilsulfóxido e meio cultura líquido (1:2:9,5) para realização das diluições seriadas (fator 1:2) obtendo as seguintes concentrações de cada fitoterápico: 3,0; 1,5; 0,75; 0,375; 0,188; 0,094; 0,047; 0,023 (% v/v).

<sup>1</sup> Doutorando em Aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp; Engenheiro de Pesca. Endereço eletrônico: thg\_silva@hotmail.com Telefone: (16) 3209-7477

<sup>2</sup> Mestranda em microbiologia pelo programa de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp, Bióloga. Endereço eletrônico: su\_kotzent@hotmail.com Telefone: (16) 3209-7477

<sup>3</sup> Doutoranda em aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp, Médica Veterinária. Endereço eletrônico: sigallani@hotmail.com Telefone: (16) 3209-7477

<sup>4</sup> Doutorando em aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp, Médico Veterinário. Endereço eletrônico: gmrvalladao@gmail.com Telefone: (16) 3209-7477

<sup>5</sup> Mestranda em aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp, Médica Veterinária. Endereço eletrônico: ksg.sjrp@hotmail.com Telefone: (16) 3209-7477

<sup>6</sup> Pesquisadora pelo Centro de Aquicultura da Unesp, Bióloga. Endereço eletrônico: fabianap@caunesp.unesp.br Telefone: (16) 3209-7477



Por fim, 50  $\mu$ l de solução bacteriana contendo  $10^8$  UFC·mL foi adicionada em cada poço. O experimento foi realizado em triplicata com três grupos controles: meio líquido, meio líquido mais solução do óleo essencial e meio líquido mais a bactéria. As microplacas foram incubadas a 29°C por 24 horas e em seguida foi adicionado o corante trifeniltetrazólio para avaliação macroscópica do crescimento bacteriano. Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos patógenos. De cada poço foi realizada a contagem do número de células viáveis através do plaqueamento em ágar Muller-Hinton para definição da concentração mínima bacteriostática (CMB). Verificou-se que a CIM e CMB do óleo de Citronela foi respectivamente 0,187% e 0,75% para *A. hydrophila*; 0,093% e 0,187% para *E. tarda* e 0,187% e 0,375% para *S. aureus*. Para o óleo de Manjerição a CIM e CMB foi de 0,75% para *A. hydrophila* e *S. aureus*; para *E. tarda* foi de 0,187% e 0,75% respectivamente. Conforme o resultado observado pode-se concluir que a aplicação do óleo de citronela apresenta uma maior função bactericida quando comparado ao óleo de manjerição, apresentando uma atividade bactericida maior para *E. tarda* podendo ser indicativo de um potencial produto antimicrobiano e uma alternativa ao uso de antimicrobianos na aquicultura.



# AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAS DE LARANJA DOCE E TOMILHO BRANCO

## ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SWEET ORANGE AND WHITE THYME ESSENTIAL OILS

Suzana Kotzent<sup>(1)</sup>  
Thiago F. A. Silva<sup>(2)</sup>  
Silvia U. Gallani<sup>(3)</sup>  
Gustavo R. M. Valladão<sup>(4)</sup>  
Katia S. Gozi<sup>(5)</sup>  
Fabiana Pilarski<sup>(6)</sup>

### Resumo

O uso de antimicrobianos na aquicultura tem sido bastante questionado por promover a resistência bacteriana e acumular resíduos nos animais e no ambiente. Por isto, pesquisas vêm sendo realizadas para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos de origem natural. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antibacteriana dos óleos essenciais de laranja doce (*Citrus aurantium linne*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*) contra os potenciais patógenos de peixes, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* e *Edwardsiella tarda*. A ação antimicrobiana foi testada através de ensaios de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB). As bactérias utilizadas foram adquiridas no banco de cepas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do CAUNESP (todas previamente identificadas através do gene 16S rRNA) e plaqueadas em ágar Mueller-Hinton. A CMI foi realizada em microplacas de 96 poços, os poços foram preenchidos previamente com 150 µL de caldo Mueller-Hinton. Nos primeiros poços de cada placa foram adicionados 150 µL de uma solução estoque contendo

<sup>1</sup> Mestranda em microbiologia pelo programa de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp, Bióloga. Endereço eletrônico: su\_kotzent@hotmail.com Telefone: (16) 3209-7477

<sup>2</sup> Doutorando em Aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp; Engenheiro de Pesca. Endereço eletrônico: thg\_silva@hotmail.com Telefone: (16) 3209-7477

<sup>3</sup> Doutoranda em aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp, Médica Veterinária. Endereço eletrônico: sigallani@hotmail.com Telefone: (16) 3209-7477

<sup>4</sup> Doutorando em aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp, Médico Veterinário. Endereço eletrônico: gmrvalladao@gmail.com Telefone: (16) 3209-7477

<sup>5</sup> Mestranda em aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Unesp, Médica Veterinária. Endereço eletrônico: ksg.sjrp@hotmail.com Telefone: (16) 3209-7477

<sup>6</sup> Pesquisadora pelo Centro de Aquicultura da Unesp, Bióloga. Endereço eletrônico: fabianap@caunesp.unesp.br Telefone: (16) 3209-7477



800 µL do óleo essencial, 1.600 µL de dimetilsulfóxido e 7,6 mL de caldo Mueller-Hinton, a concentração inicial foi de 3,0% (v/v) e, a partir deste, foram realizadas oito diluições seriadas. Posteriormente, 50 µL de solução bacteriana ( $10^8$  UFC/mL – definido através de leitura entre 0,08-0,130 em 625nm usando espectrofotômetro) foram adicionadas nos poços. Os testes foram realizados em triplicata, com três grupos controle: meio líquido, meio líquido mais solução do óleo essencial e meio líquido mais a bactéria. As placas contendo microrganismos e os controles foram incubadas durante 24 horas a 29°C e depois adicionado o corante trifeniltetrazólio para avaliação. A CMB foi realizada através do plaqueamento das diluições seriadas em meio de cultura ágar Mueller-Hinton (incubadas a 29°C por 24h). A CMI para o óleo essencial de laranja doce foi 1,5% para *A. hydrophila* e *E. tarda*, para *S. aureus* a concentração foi maior que 3,0% e a CMB de 1,5% para *A. hydrophila* e 3,0% para *S. aureus* e *E. tarda*. A CMI e a CMB para as três bactérias utilizando o óleo essencial de tomilho branco foram menores que 0,023%. A partir destes resultados pode-se concluir que os óleos essenciais apresentaram uma importante atividade bactericida e bacteriostática, requisitos básicos para sua utilização como agentes antimicrobianos em substituição a quimioterápicos, sendo que o tomilho branco apresentou melhores resultados comparando-se com o óleo de laranja doce contra as três espécies bacterianas avaliadas.

**Palavras-chave:** aquicultura, fitoterápico, microrganismo, sanidade.