

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeito da suplementação com óleo de
Copaifera ducke em *Oreochromis niloticus*
desafiadas com *Streptococcus agalactiae***

Nicoli Paganoti de Mello Correia

Jaboticabal, SP
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeito da suplementação com óleo de
Copaifera ducke em *Oreochromis niloticus*
desafiadas com *Streptococcus agalactiae***

Nicoli Paganoti de Mello Correia

Orientadora: Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Coorientador: Dr. Gustavo da Silva Claudiano

Tese apresentada ao programa de
Pós-graduação em Aquicultura do
Centro de Aquicultura da UNESP –
Caunesp, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, SP
2022

C824e Correia, Nicoli Paganoti de Mello
 Efeito da suplementação com óleo de *Copaifera ducke* em
Oreochromis niloticus desafiadas com *Streptococcus agalactiae* / Nicoli
Paganoti de Mello Correia. – – Jaboticabal, 2022
 ix, 68 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2022

Orientadora: Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Coorientador: Gustavo da Silva Claudiano

Banca examinadora: Marcello Pardi de Castro, Geovana Dotta
Tamashiro, Paulo Fernandes Marcusso, Jaqueline Dalbello Biller
Bibliografia

1. Tilápia. 2. Copaíba. 3. Imunização. 4. Imunidade. 5. Streptococcus
agalactiae. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeito da suplementação com óleo de *Copaifera ducke* em *Oreochromis niloticus* desafiadas com *Streptococcus agalactiae*

AUTORA: NICOLI PAGANOTI DE MELLO

ORIENTADOR: JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

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

Prof. Dra. Julieta Rodini Engracia de Moraes
Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Jaboticabal-SP

Prof. Dr. Marcello Pardi de Castro
Departamento de Patologia Veterinária, Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto-SP

Prof. Dra. Geovana Dotta Tamashiro
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFBA, Salvador-BA

Prof. Dr. Paulo Fernandes Marcusso
Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu-SP

Prof. Dra. Jaqueline Dalbello Biller
FCAT/UNESP, Dracena-SP

Jaboticabal, 31 de agosto de 2022

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2018/06137-1.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVOS	13
Objetivo geral	13
Objetivos específicos	13
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	14
Tilapicultura	14
<i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Flavobacterium columnare</i> no setor produtivo e antibioticoterapia	15
Extratos e óleos essenciais em peixes	17
Óleo de copaíba	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO 2: Atividade bactericida do óleo de copaíba e seus efeitos anti- inflamatórios em tilápias após suplementação oral e desafio bacteriano por <i>Streptococcus agalactiae</i>	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
Peixes e condições experimentais	31
Análises da composição química do óleo de copaíba	32
Atividade bactericida do óleo de copaíba	32
Desenho experimental	33
Preparo da dieta	34
Desempenho zootécnico	34

Amostragens sanguíneas	35
Parâmetros hematológicos	35
Parâmetros bioquímicos	36
Parâmetros imunológicos	36
Atividade de burst respiratório.....	36
Atividade de lisozima	37
Atividade de mieloperoxidase (MPO).....	37
Atividade bactericida do soro	38
Histologia e histomorfometria	38
Análises estatísticas	39
RESULTADOS.....	39
Composição do óleo de copaíba	39
Atividade bactericida do óleo de copaíba contra <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Flavobacterium columnare</i>	40
Desempenho zootécnico	41
Parâmetros hematológicos	42
Parâmetros bioquímicos	44
Parâmetros imunológicos	46
Sobrevivência cumulativa	48
Histopatologia e histomorfometria	49
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resposta <i>in vitro</i> de <i>Streptococcus agalactiae</i> (A, B e C) e <i>Flavobacterium columnare</i> (D, E e F) após 48h. A e D. Controle antibiótico. B e E. Controle sem tratamento . C e F. 10µL de óleo de copaíba.....	41
Figura 2. Parâmetros imunológicos de tilápias após suplementação com óleo de copaíba por 30 dias antes e após desafio por <i>S. agalactiae</i> . Valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0.05$) entre os tratamentos segundo Kruskal e Dunn pós -teste.	47
Figura 3. Atividade lítica do soro de tilápias após suplementação com óleo de copaíba por 30 dias. Valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0.05$) entre os tratamentos segundo Kruskal Wallis e Dunn pós-teste.	48
Figura 4. Sobrevivência cumulativa de tilápias 15 dias após desafio por <i>S. agalactiae</i>	49
Figura 5. Histologia de tilápias após 30 dias de suplementação com óleo de copaíba. A. Fígado controle. B. Fígado 1.0%. C. Baço controle. D. Baço 1.0%. E. Intestino controle (seta azul: largura da vilosidade; seta preta: altura da vilosidade). F. Intestino 1.0%.. (Barra: 20 µm / Coloração H.E.).....	50
Figura 6. Histologia de tilápias após 15 dias de desafio. A. Fígado controle PBS. B. Fígado controle bactéria com esteatose (seta amarela), picnose (seta vermelha), desarranjo cordonal (asterisco) e congestão dos sinusóides (seta preta). C. Fígado 1.0% de óleo de copaíba após desafio bacteriano apresentando esteatose (seta amarela), picnose (seta vermelha), desarranjo cordonal (asterisco) e congestão dos sinusóides (seta preta). D. Baço controle com centro melanomacrófago em formato nodular (asterisco). E. Baço controle desafiado com centro melanomacrófago em formato nodular (asterisco). F. Baço 1.0% de óleo de copaíba após desafio com centro melanomacrófago em formato nodular (asterisco). G. Vilosidade intestinal controle. H. Vilosidade intestinal necrosada (seta preta) no conrole desafiado. I. Vilosidade intestinal preservada em 1.0% após desafio bacteriano. (Barra: 20 µm / Coloração H.E.).....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da fração volátil do óleo de copaíba <i>C. ducke</i>	40
Tabela 2. Classificação da atividade bactericida do óleo de copaíba <i>in vitro</i>	41
Tabela 3. Médias do desempenho zootécnico de tilápias suplementadas com óleo comercial de copaíba por 30 dias (antes e após desafio por <i>S. agalactiae</i>)	41
Tabela 4. Valores de média e análise de variância para eritrograma de <i>O. niloticus</i> suplementadas com óleo de copaíba por 30 dias antes e após desafio por <i>S. agalactiae</i>	43
Tabela 5. Parâmetros bioquímicos de tilápias suplementadas com óleo comercial de copaíba por 30 dias antes e após desafio por <i>S. agalactiae</i>	45
Tabela 6. Histomorfometria intestinal e contagem de centro melanomacrófago do baço de tilápias suplementadas com óleo de copaíba por 30 dias.	51
Tabela 7. Classificação das lesões histopatológicas identificadas em fragmentos de fígado, baço e intestino de tilápias após 15 dias de infecção por <i>S. agalactiae</i>	53

RESUMO

O óleo de copaíba, extraído do tronco de árvores amazônicas da espécie *Copaifera* possui propriedades anti-inflamatórias demonstradas em humanos e animais além de apresentar atividade bactericida contra microrganismos. Assim, o presente estudo objetivou avaliar a atividade bactericida *in vitro* do óleo de copaíba contra as cepas patogênicas da tilapicultura e os efeitos da suplementação em *Oreochromis niloticus* sobre os parâmetros zootécnicos e sanitários. Inicialmente foram executados ensaios *in vitro* para avaliar a atividade bactericida do óleo contra cepas de *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare* (Experimento I). Para analisar os efeitos *in vivo*, os peixes foram suplementados com óleo copaíba (0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0%) por 30 dias e realizados os experimentos II e III. No experimento II após 30 dias de suplementação, foram coletadas amostras de sangue com separação de soro e plasma para análises hematológicas (contagem total e diferencial de células), bioquímicas (proteínas totais, albumina, globulina, glicose, colesterol total, triglicérides, HDL, LDL, enzimas hepáticas ALT e AST), e imunológicas (burst respiratório, lisozima, mieloperoxidase e atividade bactericida do soro das tilápias), além de análise histológica de intestino, baço e fígado. No experimento III, após 30 dias de suplementação, as tilápias foram desafiadas com *S. agalactiae* e realizadas as análises supracitadas e porcentagem relativa de sobrevivência. Os resultados *in vitro* expressaram atividade bactericida do óleo comercial contra *F. columnare* e *S. agalactiae*. A suplementação nas concentrações de 0,75% e 1,0% evidenciaram melhora de alguns dos parâmetros hematológicos, albumina e da atividade lítica do soro. O resultado da análise histomorfométrica demonstrou que o óleo aparentemente induziu aumento das vilosidades intestinais nas respectivas concentrações de 0,75% e 1,0%. O óleo não exerceu influência sobre a porcentagem relativa de sobrevivência de peixes infectados. Conclui-se que o óleo de copaíba apresenta atividade bactericida *in vitro* contra patógenos de tilápias e atividade anti-inflamatória em tiápias desafiadas com *Streptococcus agalactiae* nas doses preconizadas.

Palavras-chave: Tilápia; Óleo de copaíba; Imunoestimulante; Imunidade Inata; *Streptococcus agalactiae*.

ABSTRACT

Copaiba oil extracted from the trunk of Amazonian trees of the *Copaifera* species has anti-inflammatory properties demonstrated in humans and animals, besides of having bactericidal activity against microorganisms. This study aimed to evaluate the *in vitro* bactericidal activity of copaiba oil against pathogenic bacterias of tilapia culture and the effects of supplementation in *Oreochromis niloticus* on zootechnical and sanitary parameters. Initially, *in vitro* assays were performed to evaluate the bactericidal activity of the oil against strains of *Streptococcus agalactiae* and *Flavobacterium* (Experiment I). To analyze the *in vivo* effects, the fish were supplemented with copaiba oil (0.25%, 0.50%, 0.75% and 1.0%) for 30 days and experiments II and III were carried out. In experiment II, after 30 days of supplementation, blood samples were collected with separation of serum and plasma for hematological (total and differential cell counts), biochemical (total proteins, albumin, globulin, glucose, total cholesterol, triglycerides, HDL, LDL, liver enzymes ALT and AST), and immunological (respiratory burst, lysozyme, myeloperoxidase and bactericidal activity of tilapia serum), in addition to histological analysis of intestine, spleen and liver. In experiment III, after 30 days of supplementation, the tilapia were challenged with *S. agalactiae* and the aforementioned analyzes and cumulative survival were performed. The results showed that the oil showed *in vitro* bactericidal activity against *F. columnare* and *S. agalactiae*. Supplementation at concentrations of 0.75% and 1.0% demonstrated improvement in some of the hematological parameters, albumin and serum lytic activity. The histomorphometric analysis showed that the oil apparently induced an increase in intestinal villi at the respective concentrations of 0.75% and 1.0%. The oil had no influence on cumulative survival in infected fish. Conclusion: copaiba oil has *in vitro* bactericidal activity against tilapia pathogens and anti-inflammatory activity in tilapia challenged with *S. agalactiae* at tested doses.

Keywords: Tilapia; Copaiba oil; Immunostimulant; Innate Immunity; *Streptococcus agalactiae*.

INTRODUÇÃO GERAL

A atividade de aquicultura cresce a nível mundial a cada ano e está sendo considerada uma das mais importantes fontes de nutrição para o futuro. A previsão de crescimento para o setor é de mais de 14% até o ano de 2030 (FAO, 2022). No Brasil, evidencia-se um forte crescimento nesta atividade, sendo que, no setor de piscicultura a produção de peixes de cultivo já ultrapassou 841 mil toneladas (PEIXE BR, 2022). Dentre as espécies mais cultivadas no país, a tilápia corresponde a 63,5% desta produção (PEIXE BR, 2022).

Entretanto, nestes sistemas intensivos, existem fatores que contribuem para a proliferação de patógenos de origem bacteriana como: manejo inadequado, baixa qualidade de água, elevada densidade de estocagem, amônia e nitrito e o excesso de resíduos orgânicos no viveiro, sendo este último, o grande contribuinte para a multiplicação de bactérias (MARCELINO, 2016).

No Brasil, as principais bacterioses que afetam o setor de tilapicultura são causadas por *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda* e a estreptococose causadas pelas bactérias *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. ictaluri* (MARCELINO, 2016; ZHANG et al., 2018; DELPHINO et al., 2019; JUNIOR et al., 2020). Além disso, a tilápia está susceptível também à columnariose causada pela *Flavobacterium columnare* que também contribui para o aumento na taxa de mortalidade (XU et al., 2014). Bacterioses como estas são normalmente tratadas com o uso de antibióticos adicionados à ração. Porém, este método de antibioticoterapia pode ser inviável uma vez que o animal doente reduz o apetite em situações infecciosas (MARCELINO, 2016). Além disso, o uso inadequado de antibióticos pode levar ao surgimento de patógenos resistentes aos antimicrobianos (CHIESA et al., 2018) e contribuir para a poluição do meio ambiente (ZHONG et al., 2018).

Assim, é crescente a busca por tratamentos alternativos. Dentre as alternativas, o uso de óleos essenciais e extratos de plantas destacam-se, devido aos efeitos imunomodulador e anti-inflamatório observados em peixes que contribuem para prevenção e controle de bacterioses (YUNIS-AGUINAGA et al., 2016). Os fitoterápicos são alternativas ecologicamente sustentáveis e econômicas para redução da quantidade de antibióticos utilizados em aquicultura

(SOUZA et al., 2015; BRUM et al., 2017; BRUM et al., 2018; SILVA et al., 2019; SOUZA et al., 2019).

O óleo de copaíba é um fitoterápico que possui ação anti-inflamatória, cicatrizante, antisséptica (HECK et al., 2012) antitumoral (LIMA et al., 2003), antibacteriana e antimicrobiana (SANTOS et al., 2008). Também foram relatados efeitos germicida, expectorante, diurético (VEIGA JÚNIOR et al., 2002) e ação anti-diabética (CARVALHO et al., 2017) com capacidade de reduzir o estresse oxidativo em animais com hiperglicemia (BASHA & SANKARANARAYANAN, 2016). Foi observado, ainda, efeito analgésico em humanos e animais (RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004). Este óleo é extraído do tronco de árvores nativas da região Amazônica e possui as frações óleo-resina e óleo essencial com ação anti-inflamatória mais eficaz do que o diclofenaco de sódio em humanos (CAVALCANTE, 2013). Esta planta é utilizada na medicina popular há mais de 500 anos por conta destas propriedades. Sendo assim, explorar as frações dos componentes do óleo de copaíba é uma fonte alternativa no tratamento de patologias animais e humanas (PIERI et al., 2009).

A composição do óleo de copaíba é a base de sesquiterpenos como cubeno e cadineno, ácidos graxos, cumarina, tocoferol, bisaboleno, ácido copálico, cariofileno, flavonas, copaeno, copaína, carioazuleno, humuleno, saponinas, quininos, taninos e selineno (CAVALCANTE, 2013). Dentre os compostos do óleo, a resposta anti-inflamatória se dá pela ação do cariofileno (CAVALCANTE, 2013). Em estudos realizados em ratos com artrite induzida por adjuvante foi observado que os efeitos debilitantes das inflamações articulares e sistêmicas foram reduzidos nos animais após o tratamento com o óleo de copaíba (COMAR et al., 2013). Sua ação como receptor agonista seletivo do canabinóide periférico (CB2) demonstrou estar relacionada ao processo de inflamação e dor (GERTSCH et al., 2008) além de ser um dos principais componentes do óleo de copaíba e atuar como um potente anti-inflamatório por meio da inibição das vias histamínicas e serotoninérgicas com efeito antinociceptivo (mediado por receptores opioides) (GOMES et al., 2010; LUCCA et al., 2015).

Outros benefícios do óleo de copaíba, estão relacionados à atividade antimicrobiana e antifúngica que age contra bactérias e fungos em condições infecciosas (TOBOUTI et al., 2017). A ação antimicrobiana contra patógenos

(YANG et al., 2015) foi observada no trabalho realizado por Yoo e Jwa (2018) em que houve inibição do crescimento de biofilmes microbianos de *Streptococcus mutans*, comprovando a eficácia antimicrobiana do cariofileno. Isto porque o cariofileno tem capacidade de penetrar em biofilmes que protegem as bactérias, auxiliando também na inibição da formação do mesmo (YOO & JWA, 2018). Em peixes, foi demonstrado efeito antiparasitário do óleo de copaíba da espécie *Copaifera ducke*, utilizadas na imersão de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) infectados por parasitas monogêneos (COSTA et al., 2017). Os autores ressaltam que o óleo-resina é uma alternativa promissora no tratamento contra estes parasitas. Contudo, ainda não se sabe o que o óleo de copaíba causaria no organismo de tilápias suplementadas ou se este fitoterápico teria efeitos anti-inflamatórios e bactericidas em situações de infecção induzida por patógenos como *Streptococcus agalactiae*.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos anti-inflamatórios e antimicrobiano do óleo de copaíba em tilápias desafiadas com a bactéria *Streptococcus agalactiae*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a resposta imune do óleo de copaíba em *Oreochromis niloticus* e seu desempenho zootécnico quando desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

Objetivos específicos

- Quantificar os princípios ativos do óleo de copaíba por cromatografia gasosa;
- Avaliar a atividade bactericida *in vitro* contra cepas patogênicas de *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare*;
- Investigar os efeitos do uso do óleo de copaíba após 30 dias de suplementação sobre o desempenho zootécnico, o perfil clínico laboratorial, a imunidade inata, histopatologia e sobrevivência de *Oreochromis niloticus* desafiadas ou não com *Streptococcus agalactiae*.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

Tilapicultura

A atividade de aquicultura vêm crescendo anualmente e está sendo considerada uma importante fonte de nutrientes no futuro (FAO, 2022). No ano de 2020, a aquicultura e produção total de pesca atingiram um recorde de 214 milhões de toneladas, sendo 20,2 kg per capita destinados ao consumo humano. Estima-se que cerca de 600 milhões de pessoas têm a aquicultura como principal fonte de renda (FAO, 2022). O comércio internacional da pesca e da aquicultura geraram cerca de 151 bilhões de dólares em 2020, ficando abaixo apenas do recorde de 2018 que foi de 165 bilhões de dólares. Esta queda de faturamento se deu devido à pandemia causada pelo Covid-19 (FAO, 2022). Entretanto, o consumo mundial de alimentos aquáticos (peixes, crustáceos, dentre outros) continuam a crescer constantemente, e, a previsão é de que até 2030 a aquicultura cresça mais 14% (FAO, 2022).

Dentro da atividade de aquicultura, o setor de tilapicultura está em constante crescimento. O Brasil é considerado um dos quatro maiores produtores de tilápias no mundo. No ano de 2017 o país produziu 357.639 toneladas de tilápias, ocupando a quarta posição no ranking de produção mundial. Este ranking foi liderado pela China em primeiro lugar com 1,8 milhões de toneladas, seguida pela Indonésia com 1,1 milhão de toneladas e o Egito ocupando a terceira posição mundial com produção de 800.000 toneladas de tilápias (PEIXE BR, 2022).

No ano de 2018, a tilapicultura no Brasil atingiu a produção de 722.560 toneladas, representando aumento de 4,5% com relação ao ano de 2017 (PEIXE BR, 2022). A piscicultura brasileira é favorecida pela abundância dos recursos hídricos, pelas dimensões continentais, clima e empreendedorismo dos produtores (PEIXE BR, 2022). Esses fatos contribuíram para a produção de tilápias aumentar ainda mais no ano de 2019, atingindo a produção de 758.006 toneladas, sendo considerado o maior índice de proteína animal produzida no país e garantindo a quarta posição do Brasil no ranking mundial de produção pelo terceiro ano consecutivo (PEIXE BR, 2022). A tilapicultura brasileira produziu mais de 486 mil toneladas no ano de 2020 e ultrapassou a produção total de 802.930 toneladas de peixes de cultivo (PEIXE BR, 2022).

Atualmente, a tilapicultura no Brasil ultrapassou a produção de 63%, sendo o estado do Paraná o líder em produção, ocupando o 1º lugar no ranking da tilapicultura, seguido dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul que ocuparam, respectivamente, as posições de 2º, 3º, 4º e 5º lugares (PEIXE BR, 2022).

O aumento no sistema de produção de peixes vêm para suprir a demanda de consumo que cresce anualmente (FAO, 2022; PEIXE BR, 2022). Contudo, nestes sistemas intensivos, fatores como manejo inadequado, baixa qualidade de água, elevada densidade de estocagem, amônia, nitrito e excesso de resíduos no viveiro contribuem para o surgimento de patógenos de origem bacteriana. As bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare* estão entre as principais responsáveis pela mortalidade de peixes, especialmente em tilápias (XU et al., 2014; MARCELINO, 2016; ZHANG et al., 2018; DELPHINO et al., 2019; JUNIOR et al., 2020).

***Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare* no setor produtivo e antibioticoterapia**

A bactéria *S. agalactiae* é um patógeno Gram-positivo também conhecido como estreptococo do grupo B (GBS) que se tornou um dos principais patógenos de tilápias na última década (CHEN et al., 2012; WANG et al., 2015; LEIRA et al., 2016). No Brasil há ocorrência das três espécies de estreptococos que são capazes de causar infecções em tilápias, porém, a *S. agalactiae* é a que mais prevalece na tilapicultura brasileira, sendo amplamente distribuída no território nacional (CHIDEROLI et al., 2017; TAVARES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

A estreptococose causada por esta bactéria é caracterizada por septicemia e meningoencefalite (YI et al., 2019). Além disso, a *S. agalactiae* causa sinais clínicos como natação errática, anorexia, letargia, falta de coordenação nos movimentos, exoftalmia, hemorragia intraocular, córnea opaca, melanose, ascite, petéquias hemorrágicas sobre a superfície do corpo e abscessos em músculos e tegumentos (CHEN et al., 2012; MISHRA et al., 2018).

De acordo com Nizet (2002), esta bactéria expressa mecanismo de virulência presente na cápsula polissacarídea com capacidade de inibir a fagocitose realizada pelos neutrófilos e macrófagos do organismo hospedeiro.

Este mecanismo de virulência permite a sobrevivência intracelular da bactéria no fagócito, além de permitir que migre para o sistema nervoso central. A patogenicidade se dá pela capacidade que os polissacarídeos tem de inibir a fagocitose por meio do ácido siálico que impede que o componente C3b do sistema complemento se deposite (JARVA et al., 2003).

A proliferação desta bactéria é favorecida por fatores como altas densidades de estocagem, baixos níveis de oxigênio e qualidade da água nos viveiros e temperaturas acima de 28°C. As temperaturas elevadas durante a primavera e o verão contribuem para maior disseminação da doença causada pela infecção por estes estreptococos (AQUACULTURE BRASIL, 2017).

A bactéria *Flavobacterium columnare* é um microrganismo patogênico, em forma de bastonete Gram-Negativo que está presente em água doce sendo causador da doença columnariose que necrosa as brânquias de peixes infectados, lesionando esta estrutura essencial de sobrevivência desses organismos (GRIFFIN et al., 1992; LIU et al., 2019). Esta enfermidade acomete peixes no mundo todo (ARIAS et al., 2004; FIGUEIREDO & LEAL, 2008) e, uma vez que a bactéria se adere às nadadeiras, brânquias e pele, é capaz de causar erosões, necrose muscular e destruição das nadadeiras, uma vez que o tecido adjacente é comprometido (DECOSTERE et al., 1999). Assim como o que é feito para *S. agalactiae* o tratamento é por meio do uso de antibióticos na ração, que por sua vez, geram resíduos na água e podem levar ao surgimento de cepas resistentes (FIGUEIREDO & LEAL, 2008).

Para o tratamento de bacterioses como essas em tilapicultura no Brasil, os antibióticos oxitetraciclina e florfenicol são os únicos com autorização de uso de acordo com a Portaria nº 444 de dezembro de 2014 (MPA, 2014), por conta da capacidade de difusão em tecidos corpóreos e fluídos (RIGOS et al., 2004), eficácia em uma vasta gama de microrganismos (PEREIRA-MAIA et al., 2010) e baixo custo (ELIA et al., 2014), sendo excretado para o meio ambiente por meio do trato gastrointestinal (BJÖRKLUND & BYLUND, 1990).

No setor da tilapicultura, os peixes que estão na fase final de crescimento são os principais grupos de risco e a antibioticoterapia é a única alternativa de tratamento (AQUACULTURE BRASIL, 2017). Porém, o tratamento com antibiótico na ração pode ser inviável por conta da redução do apetite do animal perante a infecção (MARCELINO, 2016).

Atualmente observa-se um crescimento da utilização de antibióticos no tratamento de doenças e profilaxias. Os antimicrobianos que não são totalmente metabolizados pelo organismo são liberados no ambiente aquático e causam efeitos negativos nas espécies não-alvos (KOVALAKOVA et al., 2020) como algas de água doce, micrófitas, macrófitas, zooplâncton e microcrustáceos (KUMAR et al., 2012; MINGUEZ et al., 2016).

No estudo que investigou o destino de antibióticos utilizados em aquicultura de água doce realizado por Zhong et al. (2018), os autores observaram que o antibiótico gerou altas taxas de resíduos em sistema de criação intensiva. Yang et al. (2008) e Zounkova et al. (2011) afirmam que os resíduos de antibióticos que são diretamente ou indiretamente descarregados no meio ambiente causam efeitos tóxicos nos organismos aquáticos.

Sendo assim, métodos alternativos de prevenção e controle de doenças como o uso de óleos essenciais e extratos de plantas são constantemente explorados para que se possa reduzir a quantidade de antibióticos utilizados em aquicultura (SOUZA et al., 2015; BRUM et al., 2017; BRUM et al., 2018; SILVA et al., 2019; SOUZA et al., 2019).

Extratos e óleos essenciais em peixes

As plantas medicinais são utilizadas há décadas como fonte natural no tratamento de infecções por possuírem propriedades terapêuticas capazes de ativar o sistema imune de humanos e animais (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004; PACKER et al., 2007).

Cada vez mais, o uso de extratos e óleos provindos de plantas medicinais são utilizados como fonte alternativa de tratamento perante infecções. O extrato unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*) adicionado à ração nas concentrações de 150, 300 e 450 mg/Kg aumentaram a taxa de crescimento de tilápias *O. niloticus* quando comparadas aos peixes não suplementados, além de estimular a resposta imunológica dos organismos seis horas após infecção por *S. agalactiae* por meio do aumento do número de leucócitos circulantes (YUNIS-AGNAGA et al., 2015).

O extrato da planta amazônica camu-camu (*Myrciaria dúbia*) rica em vitamina C adicionada à ração nas concentrações de 50, 100, 250 e 500 mg/Kg estimulou o sistema imune e aumentou a contagem de células brancas do sangue,

atividade respiratória, lisozimática e bactericida sérica, além de aumentar a aglutinação direta e a contagem dos centros melanomacrófagos, comprovando a atividade microbiana e anti-inflamatória deste extrato pós-infecção de tilápias por *Aeromonas hydrophila* (YUNIS- AGUINAGA et al., 2016). Este mesmo extrato nas concentrações de 500 mg/Kg também auxiliou no crescimento dos peixes após 5 semanas de administração (YUNIS-AGUINAGA et al., 2016).

O extrato de *Excoecaria agallocha* oferecido nas concentrações de 50 mg/Kg para *O. niloticus* por 28 dias, aumentou a atividade fagocítica, lisozimática e burst respiratório pré e pós-infecção induzida por *S. agalactiae*, melhorando a resposta imune não-específica e a resistência contra este patógeno (LAITH et al., 2017). O extrato de gengibre chinês (*Boesenbergia rotunda*) na concentração de 10 g/Kg na ração aumentou a atividade de lisozima, peroxidase, burst respiratório e fagocitose nas tilápias após infecção por *S. agalactiae* (DOAN et al., 2019a). Doan et al. (2019a) sugeriram que houve aumento da resistência da tilápia contra o agente patogênico causador da estreptococose. Doan et al. (2019b) observou que o extrato de chá-preto (*Camellia sinensis*) nas concentrações de 1, 2, 4, e 8 g/Kg de ração ofereceu resistência para a *O. niloticus* contra *S. agalactiae* aumentando a lisozima sérica, peroxidase, complemento alternativo (ACH50), atividade fagocítica e burst respiratório com relação aos peixes que não receberam o extrato após quatro e oito semanas de suplementação.

Além do uso de extratos, os óleos essenciais extraídos de plantas também são fontes alternativas que dão resultados em fitoterapia favorecendo o sistema imune e agindo contra alguns patógenos. O óleo essencial extraído da caneleira-verdadeira (*Cinnamomum zeylanicum*) foi altamente eficaz contra 10 espécies de *Pseudomonas* isoladas de peixes o que recomenda seu uso como antimicrobiano (KACÁNIOVÁ et al., 2017). Os óleos extraídos da citronela (*Cymbopogon nardus*), orégano (*Origanum vulgare*), erva-doce (*Foeniculum vulgare*) e tomilho (*Thymus serpyllum*) mostraram grande potencial antioxidante nas respectivas concentrações de 93,86 µg/ml, 83,47 µg/ml, 76,74 µg/ml e 74,28 µg/ml (KACÁNIOVÁ et al., 2017).

As tilápias suplementadas com os óleos essenciais extraídos do manjerição (*Ocimum gratissimum*) e do gengibre (*Zingiber officinale*) nas concentrações de 0,50%, 1,0% e 1,5 melhoraram o crescimento, a resposta imune e a resistência às doenças no período de 55 dias de suplementação e após

infecção por *S. agalactiae*. Todas as concentrações apresentaram aumento na atividade fagocítica, exceto em 1,5% de óleo essencial de gengibre, além de neutrófilos maiores em peixes tratados com 1,0% de óleo de gengibre (BRUM et al., 2017).

Além disso, o uso desses óleos essenciais foi benéfico e reduziu o colesterol e o triglicérides nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% em peixes, além de aumentar a atividade lisozimática (BRUM et al., 2018). O óleo essencial extraído do hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) nas dosagens de 0,125% e 0,25% na ração aumentaram a concentração de proteínas plasmáticas em tilápias após suplementação por 50 dias (SILVA et al., 2019). Silva et al. (2019) indicam que o óleo de *M. piperita* foi eficaz contra *S. agalactiae* por aumentar a resistência dos peixes durante o período de infecção e reduzir a taxa de mortalidade no grupo tratado com 0,25% desse óleo essencial.

Dentre os óleos essenciais, o óleo de copaíba possui atividade antimicrobiana e antifúngica e age contra bactérias e fungos sendo benéfico em muitas condições infecciosas (TOBOUTI et al., 2017), conforme observado *in vitro* contra *S. mitis*, *S. mutans* e *S. sanguinis* (SIMÕES et al., 2016). A oleoresina extraída da espécie *Copaifera ducke* apresentou atividade anti helmíntica contra parasitas homogêneos *Anacanthorus penilabiatus* e *Mymarothecium viatorum* em pacus, *Piaractus mesopotamicus*, em banhos de imersão nas concentrações de 50 mg/L (COSTA et al., 2017). Destes dados depreende-se que os imunostimulantes são utilizados na alimentação dos peixes como aditivos alimentares para melhorar a saúde do animal, proporcionando ganho de peso e/ou resistência às doenças (VALLEJOS-VIDAL et al., 2016). Contudo, ainda são escassos os estudos com o uso do óleo de copaíba em dietas suplementadas para *O. niloticus* pré e pós-infecção induzida por *S. agalactiae*.

Óleo de copaíba

No Brasil existem aproximadamente 25 espécies de *Copaifera*, dentre elas, a espécie *Copaifera ducke* é uma árvore nativa da região amazônica da qual é extraído o óleo ou óleo-resina por meio de um orifício feito no tronco dessa copaíba para drenagem do óleo (HECK et al., 2012; KLAUBERG et al., 2014).

Estudos demonstram que o óleo de copaíba tem capacidade de reduzir inflamações articulares e sistêmicas em ratos com artrite (COMAR et al., 2013). Isto porque o cariofileno presente nesta substância possui ação como receptor agonista seletivo do canabinóide periférico (CB2) que está relacionado ao processo de inflamação e dor (GERTSCH et al., 2008). Além disso, o cariofileno consegue inibir as vias histamínicas e serotoninérgicas com efeito antinociceptivo que é mediado por receptores opióides (GOMES et al., 2010; LUCCA et al., 2015). Além de ação anti-inflamatória, foi demonstrado que o cariofileno tem capacidade de atuar como antiparasitário contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis* *in vitro* nas concentrações de 50 e 100 µg/mL (LEITE et al., 2013).

O óleo-resina e suas frações de ácido, por exemplo, foram eficazes contra bactérias Gram-positivas *in vitro* *Enterococcus faecium* nas concentrações de 4,2 e 4,8 µg/mL e *Staphylococcus aureus* em 5,3 e 7,2 µg/mL, manifestando o grande potencial do óleo como bactericida (BARBOSA et al., 2019). De maneira geral, o óleo-resina extraído das espécies de *Copaifera* são remédios naturais eficazes em muitos tipos de tratamentos como os de pele (ESTEVÃO et al., 2009), infecções do trato urinário, doenças respiratórias, úlceras, reumatismo, herpes, além de possuir propriedades antitéticas em humanos (VEIGA-JÚNIOR et al., 2002), antitumorais em ratos (OHSAKI et al., 1994) e analgésicas (BOAROTO et al., 2018) para ambas as espécies. Além de apresentar baixa toxicidade (TEIXEIRA et al., 2017; BARBOSA et al., 2019) a oleoresina ajuda a modular a resposta inflamatória por meio da diminuição do infiltrado inflamatório crônico e o edema (TEIXEIRA et al., 2017).

Por fim, o óleo de copaíba possui atividade bactericida e pode ajudar contra diferentes cepas patogênicas de bactérias que estão presentes no setor da piscicultura (MENDONÇA & ONOFRE, 2009; ALENCAR et al., 2015; SIMÕES et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2016; PIERI et al., 2016; TOBOUTI et al., 2017). Por conta dessas diversas propriedades, esta planta é utilizada na medicina popular há mais de 500 anos. Explorar os componentes do óleo extraído pode ser uma fonte alternativa para tratar enfermidades humanas e animais (PIERI et al., 2009), uma vez que a oleoresina de copaíba da *Copaifera ducke* que é comumente encontrada em mercados populares na região amazônica possui grande potencial de cura e atividade anti-inflamatória (VEIGA-JÚNIOR et al., 2007). Contudo, ainda são escassos os estudos a respeito dos efeitos do óleo de

copaíba em peixes de cultivo como as tilápias, que possuem importância econômica relevante para a economia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H; POBER, JORDAN S. *Imunologia celular e molecular*. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 486p.

ABREU J.S., MARZOCCHI-MACHADO C.M., URBACZEK, FONSECA L.M., URBINATI E.C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 1133-1139, 2009.

ACAR, U.; KESBIÇ, O. S.; YILMAZ, S.; GÜLTEPE, N.; TURKER, A. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease and resistance against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, v. 437, p. 282-286, 2015.

ALENCAR, E. N.; XAVIER-JUNIOR, F. H.; MORAIS, A. R.; DANTAS, T. R.; DANTAS-SANTOS, N.; VERISSIMO, L. M.; REHDER, V. L.; CHAVES, G. M.; OLIVEIRA, A. G.; EGITOL, A. S. Chemical characterization and antimicrobial activity evaluation of natural oil nanostructured emulsions. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 15, n. 1, p. 880–888, 2015. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9187>

AL-SAGHEER, A. A.; MAHMOUD, H. K.; REDA, F. M.; MAHGOUB, S. A.; AYYAT, M. S. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, p. 1006-1014, 2018. <https://doi.org/10.1111/anu.12637>

ALY, S.M.; AHMED, Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A.; MOHAMED, M.F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n.1, p. 128-136, 2008.

AMES-SIBIN, A. P.; BARIZÃO, C. L.; CASTRO-GHIZONI, V.; SILVA, F. M. S.; SÁ-MAKANISHI, A. B.; BRACHT, L.; BERSANI-AMADO, C. A.; MARÇAL-NATALI, M. R.; BRACHT, A.; COMAR, J. F. β-Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, p. 10262-10277, 2018. <http://DOI:10.1002/jcb.27369>

ANDERSON D.P., SIWICKI A.K. Basic hematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J. R.; SUBASINGLE, R. P. (Ed.). *Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society*, p. 185-202, 1995.

ANDRADE, Z.; BARRETTO NETTO, M.; BRITO, T.; MONTENEGRO, M. **Patologia; processos gerais**. 3 ed. Atheneu: São Paulo, 1992. 263p.

ANSELL, B.J., WATSON, K.E., FOGELMAN, A.M., NAVAB, M. FONAROW, G.C. 2005. High-density lipoprotein function recent advances. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 46, p. 1792–1798, 2005.

AQUACULTURE BRASIL. **Estreptococoses na tilapicultura**. 2017. Disponível em: <<http://www.aquaculturebrasil.com/2017/01/31/estreptococoses-na-tilapicultura/>>. Acesso em 07 de abr. 2020.

ARIAS, C. R. et. al. Genetic fingerprinting of *Flavobacterium columnare* isolates from cultured fish. **J. Applied Microbiol.**, 97, 421-428, 2004.

BARBOSA, A. L. P.; WENZEL-STORJOHANN, A.; BARBOSA, J. D.; ZIDORN, C.; PEIFER, C.; TASDEMIR, D.; ÇIÇEK, S. S. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 94-100, 2019.

BASHA, R. H.; SANKARANARAYANAN, C. Caryophyllene, a natural sesquiterpenelactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. **Chem. Biol. Interact.**, v. 245, p. 50–58, 2016.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; MONTASSIER, H. J.; TAKAHASHI, L. S.; URBINATI, E. C. Levamisole promotes an adjuvant effect on the immunity of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) when immunized with *Aeromonas hydrophila*, even when provided in the diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 164-173, 2016.

BJÖRKLUND, H.; BYLUND, G. Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, v. 84, p. 363-372, 1990.

BOAROTO, J. A.; FERNANDES, A. B.; MOREIRA, L. M.; SILVEIRA, Jr. L.; LIMA, C. J. de. Identification and quantification of β -caryophyllene in copaiba oil using Raman spectroscopy. **Instrumentation Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 265-276, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1080/10739149.2017.1380662>.

BRUM, A.; CARDOSO, L.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; MOURIÑO, J. L. P.; MARTINS, M. L. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 490, p. 98-107, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.040>

BRUM, A.; PEREIRA, S. A.; CARDOSO, L.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; MOURINO, J. L. P.; MARTINS, M. L. Blood biochemical parameters and melanomacrophage centers in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger. **Fish & Shellfish Immunology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.021>

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

CAPUTO, L.S.; CAMPOS, M.I.C.; DIAS, H.J.; CROTTI, A.E.M.; FAJARDO, J.B.; VANELLI, C.P.; PRESTO, A.C.D.; ALVES, M.S.; AARESTRUP, F.M.; PAULA, A.C.C.; FILHO, A.A.D.S.; AARESTRUP, B.J.V.; JUNIOR, O.S.P.; CORRÊA, J.O.A. Copaiba oil suppresses inflammation in asthmatic lungs of BALB/c mice induced with ovalbumin. **International Immunopharmacology**, v. 80, 2020. 106177. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106177>

CARVALHO, H. O.; DOS SANTOS, I. V. F.; ROCHA, C. F. da; BARROS, A. S. A.; FARIA e SOUZA, B. S.; FERREIRA, I. M.; BEZERRA, R. M.; LIMA, C. S.; CASTRO, A. N.; CARVALHO, J. C. T. Effect of the treatment of *Copaifera duckei* oleoresin (coapiba) in streptozotocin – induced diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 26, p.8, 2017.

CASTRO M.P., CLAUDIANO G.S., PETRILLO T.R., SHIMADA M.T., BELO M.A.A., MARZOCCHI-MACHADO C.M., MORAES J.R.E., MANRIQUE W.G., MORAES F.R. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, p. 284-290, 2014.

CAVALCANTE, R. **Fitodontologia**. 1. Ed. Rio Branco, 2013. 267p.

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

- CHIDEROLI, R. T.; AMOROSO, N.; MAINARDI, R. M.; SUPHORONSKI, S. A.; PADUA, S. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; MOSELA, M.; MORALES, A. T. P.; OLIVEIRA, A. G.; ZANOLO, R.; SANTIS, G. W. D.; PEREIRA, U. P. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil, **Aquaculture**, v. 479, p. 45-51, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.013>
- CHIESA, L. M.; NOBILE, M.; MALANDRA, R.; PANSERI, S.; ARIOLI, F. Occurrence of antibiotics in mussels and clams from various FAO areas. **Food Chemistry**, v. 240, p. 16–23, 2018.
- COMAR, J.C.; DE SÁ-NAKANISHI, A.B.; DE OLIVEIRA, A.L.; WENDT, M.M.N.; BERSANI-AMADO, C.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; PERALTA, R.M.; BRACHT, A. Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.58, p. 144-153, 2013.
- COSTA, J.C.DA, VALLADÃO, G.M.R., PALA, G., GALLANI, S.U., KOTZENT, S., CROTTI, A.E.M., FRACAROLLI, L., SILVA, J.J.M.DA, PILARSKI, F. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 471, p. 72–79, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.041>
- DALMO, R. A.; INGEBRIGTSEN, K., BOGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **J Fish Dis**, v. 20, p. 241–273, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00302.x>
- DECOSTERE, A. et al. Characterization of the adhesion of *Flavobacterium columnare* to gill tissue. **J. Fish Dis.**, 22, 466474, 1999.
- DELPHINO, M. K. V. C.; LEAL, C. A. G.; GARDNER, I. A.; ASSIS, G. B. N.; RORIZ, G. D.; FERREIRA, F.; FIGUEIREDO, H. C. P.; GONÇALVES, V. S. P. Seasonal dynamics of bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir, **Aquaculture**, v. 498, p. 100-108, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.023>
- DELVES, P.J., MARTIN, S.J. BURTON, D.R., ROITT, I.M. **Fundamentos de imunologia**. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 552p, 2016.
- DENSEN, P.M.G. **Granulocytic phagocytes**. Churchill Livingstone, New York, 1990.
- DEVADASON, C. (2018). Lysozyme level during acute infection of bacterium *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* in halibut and atlantic salmon. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 6, n. 1, p. 236-242, 2018.
- DILER, O.; GORMEZ, O.; DILER, I.; METIN, S. Effect of oregano (*Origanum onites* L) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture nutrition*, v. 23, p.844-851, 2017.
- DOAN, H. V.; HOSEINIFAR, S. H.; CHITMANAT, C.; JATURASITHA, S.; PAOLUCCI, M.; ASHOURI, G.; DAWOOD, M. A. O.; ESTEBAN, M. A. The effects of Thai ginseng, *oesenbergia rotunda* powder on mucosal and serum immunity, disease resistance, and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Aquaculture**, 2019a. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734388>
- DOAN, H. V.; HOSEINIFAR, S. H.; SRINGARM, K.; JATURASITHA, S.; YUANGSOI, B.; DAWOOD, M. A. O.; ESTEBAN, M. A.; RINGO, E.; FAGGIO, C. Effects of Assam tea extract on growth, skin mucus, serum immunity and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 93, p. 428-435, 2019b.
- EBRAHIMI, E.; HAGHJOU, M.; NEMATOLLAHI, A.; GOUDARZIAN, F. Effects of rosemary essential oil on growth performance and hematological parameters of young great sturgeon (*Huso huso*). **Aquaculture**, v. 521, 734909, 2020.
- ELIA, A. C.; CICCOTELLI, V.; PACINI, N.; DÖRR, A. J.; GILI, M.; NATALI, M.; GASCO, L.; PREARO, M.; ABETE, M. C. Transferability of oxytetracycline (OTC) from feed to carp muscle and

evaluation of the antibiotic effects on antioxidant systems in liver and kidney. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 40, n. 4, p. 1055-1068, 2014.

ESTEVÃO, L. R. de M.; MEDEIROS, J. P. de; SCOGNAMILLO-SZÁBO, M. V. R.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; GUIMARÃES, E. C.; CÂMARA, C. A. G. da; EVÊNCIO -NETO, J. Neoanginogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 44, n. 4, p. 406-412, abr. 2009.

FAO. Food Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture, 2022**. 266p, 2022.

FERNANDES, E.S., PASSOS, G.F., MEDEIROS, R., CUNHA, F.M.DA, FERREIRA, J., CAMPOS, M.M., PIANOWSKI, L.F., CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, v. 569, p. 228–236, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.059>

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008. ISSN on-line: 1806-9290

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J. Z.; XIE, X. Q.; ALTMANN, K. H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 105, p. 9099–9104, 2008.

GHIZONI, C. V. C.; AMES, A. P. A.; LAMEIRA, O. A.; AMADO, C. A. B.; NAKANOSHI, A. B. S.; BRACHT, L.; NATALI, M. R. M.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; COMAR, J. F. Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of Copaiba Oil Are Related to Liver Cell Modifications in Arthritic Rats, **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, p. 3409–3423, 2017. <http://DOI10.1002/jcb.25998>

GOMES, N. de M.; REZENDE, C. M. de.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. da C.; FERNANDES, P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne, **J. Ethnopharmacol.**, v.128, p. 177–183. 2010.

GRIFFIN, B. R. A simple procedure for identification of *Cytophaga columnaris*, **J. Aquat. Anim. Health**, v. 4, n. 1, p. 63-66, 1992.

GÜLTEPE, N. Protective effect of D-limonene derived from *Orange peel* essential oil against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout. **Aquaculture Reports**, v. 18, 100417, 2020.

HECK, M. C.; VIANA, L. A.; VICENTINI, V. E. P. Importância do óleo de Copaiba sp (copaíba). **SaBios: Rev. Saúde Biol.**, v. 7, p. 3866–3889, 2012.

JARVA, H.; JOKIRANTA, T. S.; WÜRZNER, R.; MERI, S. Complement resistance mechanisms of streptococci. **Molecular Microbiology, Chichester**, v. 40, n. 2-4, p. 95-107, 2003.

JUNIOR, J. A. F.; LEAL, C. A. G.; OLIVEIRA, T. F.; NASCIMENTO, K. A.; MACEDO, J. T. S. A.; PEDROSO, P. C. M. O. Anatomopathological characterization and etiology of lesions on Nile tilapia fillets (*Oreochromis niloticus*) caused by bacterial pathogens, **Aquaculture**, v. 526, 735387, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735387>

KACÁNIOVÁ, M.; TERENTJEVA, M.; VOKOVIC, N.; PUCHALSKI, C.; ROYCHOUDHURY, S.; KUNOVÁ, S.; KLUGA, A.; TOKÁR, M.; KLUZ, M.; IVANISOVÁ, E. The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, p. 1108-1116, 2017.

KLAUBERG, C.; VIDALA, E.; RODRIGUEZ, L. C. E.; DIAZ-BALTEIRO, L. Determining the optimal harvest cycle for copaíba (*Copaifera* spp.) oleoresin production, **Agric.Syst.**, v. 131, p. 116–122, 2014.

KOVALAKOVA, P.; CIZMAS, L.; McDONALD, T. J.; MARSALEK, B.; FENG, M.; SHARMA, V. K. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. **Chemosphere**, v. 251, 2020. 126351.

KUMAR, R. R.; LEE, J. T.; CHO, J. Y. Fate, occurrence, and toxicity of veterinary antibiotics in environment. **J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.**, v. 55, p. 701-709, 2012.

LAITH, A. A.; MAZLAN, A. G.; EFFENDY, A. W.; AMBAK, M. A.; NURHAFIZAH, W. W. I.; ALIA, A. S.; JABAR, A.; NAJIAH, M. Effect of *Excoecaria agallocha* on non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis niloticus* against *Streptococcus agalactiae*. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p. 192-200, 2017.

LEIRA, M. H.; BRAZ, M. S.; TANAKA, M. S.; FRANCO, V. S.; GARCIA, A. M. Estreptococose nas pisciculturas de Lavras, Sul do estado de Minas Gerais. **Nutritime**, v. 13, n. 3, p. 4672-4676, 2016. ISSN: 1983-9006.

LEITE, N. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; ALBUQUERQUE, R. S.; BRITO, D. I. V.; LAVOR, A. K. L. S.; ALENCAR, L. B. B.; TINTINO, S. R.; FERREIRA, J. V. A.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; COUTINHO, H. D. M. *In vitro* cytotoxic and antiparasitic activity of caryophyllene and eugenol against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 4, p. 522-528, 2013.

LIMA, S. R. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 1048–1053, 2003.

LIU, J.; LI, Y.; MA, F.; SU, S.; YAO, W.; WU, Z. Spatiotemporal variation of microbial community structure and physicochemical parameters in grass carp culture ponds. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 34, n.1, p. 123-133, 2019. <https://doi.org/10.1080/02705060.2019.1573203>

LUCCA, L. G.; MATOS, S. P. de; BORILLE, B. T.; DIAS, D. de O.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA Jr., V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, p. 144-148, 2015.

MARCELINO, R. A. **Principais bacterioses que afetam tilapicultura no Brasil (parte 1 e 2)**. 2016. Disponível em: <<https://3rlab.wordpress.com/2016/11/10/principais-bacterioses-que-afetam-a-tilapicultura-no-brasil-parte-1/>>. Acesso em 10 de out. 2019.

MENDONÇA, D.E; ONOFRE, S.B. 2009. Antimicrobial activity of the oil-resin produced by copaiba *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Braz. J. Farmacogn.**, v. 19 (2B), p. 577–581, 2009.

MINGUEZ, L.; PEDELUCG, J.; FARCY, E.; BALLANDONNE, C.; BUDZINSKI, H.; HALM-LEMEILLE, M. P. Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. **Environ. Sci. Pollut. Control Ser.**, v. 23, p. 4992-5001, 2016.

MISHRA, A.; NAM, G. H.; GIM, J. A.; LEE, H. E.; JO, A.; KIM, H. S. Current challenges of *Streptococcus* infection and effective molecular, cellular, and environmental control methods in aquaculture. **Molecules and cells**, v. 41, n. 6, p. 495, 2018. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2154>

NIZET, V. Streptococcal α -hemolysins: genetic and role in diseases pathogenesis. **Trends in Microbiology**, Kidlington, v. 10, n. 12, p. 575-580, 2002.

NUGRAHANI, W. A.; KUSDARWATI, R.; ULKHAQ, M. F. Experimental infection of *Streptococcus agalactiae* in silver rasbora (*Rasbora argyra*): effect to hematological profile from infected fish. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, v. 718, 012031, 2021. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/718/1/012031>

OHSAKI, A.; YAN, L. T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWAT, D.; KOMODA, Y. The isolation and in vivo potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of Brazilian medicinal plant *Copaifera langsdorfii* desfon. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 4, p. 2889–2892, 1994. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80834-9](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80834-9).

OLIVEIRA, T. F.; QUEIROZ, G. A.; TEIXEIRA, J. P.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Recurrent *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with florfenicol. **Aquaculture**, v. 493, p. 51-60, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.037>

PACKER, J. F.; LUZ, M M S da. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102-107, jan./mar. 2007.

PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuário 2022: Peixe BR da piscicultura**. 79p, 2022.

PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PIERI, F. A.; SOUZA, M. C.; VERMELHO, L. L.; VERMELHO, M. L.; PERCIANO, P. G.; VARGAS, F. S.; BORGES, A. P.; VEIGA-JUNIOR, V. F. da; MOREIRA, M. A. Use of beta-caryophyllene to combat bacterial dental plaque formation in dogs. **BMC Vet. Res.**, v. 12, n. 1, p. 216. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0842-1>

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; FIORINI, J.E.; MOREIRA, M.A.; SCHNEEDORF, J.M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Braz. Dent. J.**, v. 23, n. 1, p.36-38, 2012.

RAO. Y.V.; CHAKRABARTI, R. Enhanced anti-proteases in *Labeo rohita* fed with diet containing herbal ingredients. **Indian J Clin Biochem**, v. 19, p. 132-134, 2004.

RAO, Y.V.; DAS, B.K.; JYOTYRMAYEE, P.; CHAKRABARTI, R. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 263-273, 2006.

RIBEIRO, S. C.; CASTELO, A. S.; SILVA, B. M. P.; CUNHA, A. S.; PROIETTI JÚNIOR, A. A.; OBA-YOSHIOKA, E. T. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **ACTA Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 99-106, 2016. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201501284>

RIGAMONTE AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; WADT, L. H. de O. **Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina**. Rio Branco: EMBRAPA, 2004. 28p.

RIGOS, G.; NENGAS, I.; TYRPENOU, A. E; ALEXIS, M.; TROISI, G. M. Farmacocinética e biodisponibilidade de oxitetraciclina em goraz gilthead (*Sparus aurata*) após uma dose única". **Aquaculture**, v. 221, p. 75-83, 2003.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS, F. B. P.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. P.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Mem. I. Osvaldo Cruz, v. 103, p. 277–281, 2008.

SILVA, J. J. M. da; CREVELIN, E. J.; CARNEIRO, L. J.; ROGEEZ, H.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; MORAES, L. A. B.; BASTOS, J. K. Development of a validated ultra-high-

performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of acid diterpenes in *Copaifera* oleoresins. **Journal of Chromatography A**, v. 1515, p. 81-90, 2017.

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

SIMÕES, C. A.; CONDE, N. C.; VENÂNCIO, G. N.; MILERIO, P. S.; BANDEIRA, M. F.; da VEIGA JUNIOR, V. F. Antibacterial activity of copaiba oil gel on dental biofilm, **Open Dent. J.**, v. 10, p. 188–195, 2016.

SOUZA, C. F.; SSALBEGO, J.; GRESSLER, L. T.; GOLOMBIESKI, J. I.; FERST, J. G.; CUNHA, M. A.; HEINZMANN, B. M.; CARON, B. O.; GLANZNER, W. G.; PAULO, B. *Rhamdia quelen* (Quoy & aimard, 1824), submitted to a stressful condition: effect of dietary addition of the essential oil of *Lippia alba* on metabolism, osmoregulation and endocrinology. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 4, p. 707-714, 2015.

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

TALL, A.R. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high-density lipoproteins. **J. Intern. Med.**, v. 263, p. 256–273, 2008.

TAVARES, G. C.; QUEIROZ, G. A.; ASSIS, G. B. N.; LEIBOWITZ, M. P.; TEIXEIRA, J. P.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Disease outbreaks in farmed Amazon catfish (*Leiarus marmoratus* x *Pseudoplatystoma corruscans*) caused by *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, and *S. dysgalactiae*. **Aquaculture**, v. 495, p. 384-392, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.027>

TEIXEIRA, F. B.; SILVA, R. B.; LAMEIRA, O. A.; WEBBER, L. P.; COUTO, D'ALMEIDA, R. S.; MARTINS, M. D.; LIMA, R. R. Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats tongues. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 313, 2017. Doi: 10.1186/s12906-017-1820-2.

TIZARD I. R. Imunidade inata: inflamação. In: Tizard, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, p. 39-50, 2002.

TOBOUTI, P. L.; MARTINS, T. C. de A.; PEREIRA, T. J.; MUSSI, M. C. M. Antimicrobial activity of copaíba oil: a review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 93-99, 2017.

URIBE, C., FOLCH, H., ENRIQUES, R., MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinary Medicine**, v. 56, n. 10, p. 486-503, 2011. <https://doi.org/10.17221/3294-VETMED>

VALLEJOS-VIDAL, E.; REYES-LOPEZ, F.; TELES, M.; MACKENZIE, S. The response of fish to immunostimulant diets. **Fish & Shellfish Immunol.**, v. 56, p. 34–69, 2016.

VEIGA-JÚNIOR, F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical compositions and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke. *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v.112, p. 248–254, 2007.

WANG, R.; LI, L.; HUANG, Y.; LUO, F.; LIANG, W.; GAN, X.; HUANG, T.; LEI, A.; CHEN, M.; CHEN, L. Comparative genome analysis identifies two large deletions in the genome of highly-passaged attenuated *Streptococcus agalactiae* strain YM001 compared to the parental pathogenic strain HN016. **BMC Genomics**, v. 16, n. 897, 2015.

YANG, C.; HU, D. H.; FENG, Y. Antibacterial activity and mode of action of the *Artemisia capillaris* essential oil and its constituents against respiratory tract infection- causing pathogens. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 4, p. 2852–2860, 2015.

YANG, L. H.; YING, G. G.; SU, H. C.; STAUBER, J. L.; ADAMS, M. S.; BINET, M. T. Growthinhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 27, p. 1201-1208, 2008.

YI, M.; WANG, M.; LI, Z.; LIU, Z.; SONG, C.; ZHANG, D.; GAO, F.; KE, X.; CAO, J.; LU, M. An investigation into the effects of *Streptococcus agalactiae* on the 5-HT system and the behavior of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Reports**, v. 15, 2019. 100232.

YOO, H. J.; JWA, S. K. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. **Archives of Oral Biology**, v. 88, p. 42-46, 2018.

YUNIS-AGUINAGA, J.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; MANRIQUE, W. G.; DE MORAES, J. R. E.; DE MORAES, F. R.; FERNANDES, J. B. K. *Uncaria tomentosa* increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 47, p. 636-638, 2015.

YUNIS-AGUINAGA, J.; FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; MARINHO-NETO, F. A.; FERNANDES, J. B. K.; DE MORAES, F. R.; DE MORAES, J. R. E. Dietary camu camu, *Myrciaria dúbia*, enhances immunological response in Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 58, p. 284-291, 2016.

XU, D.; SHOEMAKER, C. A.; LAFRENTZ, B. R. Enhanced susceptibility of hybrid tilapia to *Flavobacterium columnare* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. **Aquaculture**, v. 430, p. 44-49, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.041>

ZHANG, Z.; LAN, J.; LI, Y.; HU, A.; ZHANG, J.; WEI, S. The pathogenic and microbial characteristics an emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in tilapia. **Microbial Pathogenesis**, v. 122, p. 39-45, sep. 2018.

ZHONG, Y.; CHEN, Z. F.; DAI, X.; LIU, S. S.; ZHENG, G.; ZHU, X.; LIU, S.; YIN, Y.; LIU, G.; CAI, Z. Investigation of the interaction between the fate of antibiotics in aquafarms and their level in the environment. **Journal of Environmental Management**, v. 207, p. 219-229, 2018.

ZOUNKOVA, R.; KLIEMESOVA, Z.; NEPEJHALOVA, L.; HILSCHEROYA, K.; BLAHA, L. Complex evaluation of ecotoxicity and genotoxicity of antimicrobials oxytetracycline and flumequine used in aquaculture. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 30, p. 1184-1189, 2011.

CAPÍTULO 2: Atividade bactericida do óleo de copaíba e seus efeitos anti-inflamatórios em tilápias após suplementação oral e desafio bacteriano por *Streptococcus agalactiae*

Resumo

Este estudo teve como objetivo verificar a atividade bactericida do óleo de copaíba, *Copaifera duckei*, frente aos principais patógenos da tilápia e se o aumento dos níveis dietéticos de óleo de copaíba comercial por 30 dias tem efeitos

positivos antes e após a infecção experimental com *S. agalactiae* em tilápia do Nilo, avaliando o desempenho zootécnico, parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunológicos e histológicos. Tilápias do Nilo foram distribuídas aleatoriamente em 15 tanques de fibra (250L, 28 peixes/aquário, em triplicata) em cinco tratamentos (0%, 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0%) e alimentados com ração comercial suplementada com óleo de copaíba por 30 dias. Após esse tempo, os peixes foram redistribuídos aleatoriamente para o desafio experimental com *Streptococcus agalactiae* em seis tratamentos (controle PBS, controle bactéria, 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0%) em triplicata em 18 tanques de fibra (250L/N=10). Os peixes foram anestesiados e amostras de sangue e tecidos foram coletadas para avaliação de diversos parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunológicos e histológicos antes e após o desafio. O óleo de copaíba apresentou atividade bactericida contra *Streptococcus* spp. e *Flavobacterium* spp. *in vitro*. O óleo comercial de copaíba nas concentrações de 0,75% e 1,0% melhora os parâmetros hematológicos e imunológicos, aumentando o número de leucócitos, albumina e atividade lítica sérica. Além de aumentar o comprimento das vilosidades intestinais nas concentrações 0,75% e 1,0%, contribuindo para a melhora do sistema digestivo. Após desafio bacteriano, os peixes apresentaram aumento de albumina e preservação das vilosidades intestinais em 0,75 e 1,0%. Em conclusão, o óleo de copaíba nas doses preconizadas possui ação bactericida contra *S. agalactiae* e ação anti-inflamatória em tilápias em situação de infecção induzida por *S. agalactiae*.

Palavras-chave: *Flavobacterium columnare*, imunologia, *Oreochromis niloticus*, fitoterapia, *Streptococcus agalactiae*.

INTRODUÇÃO

A tilapicultura é uma atividade em constante crescimento dentro da aquicultura (Harikrishnan et al., 2011). A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, é a espécie mais cultivada com uma produção anual de 4.525,4 mil toneladas (FAO, 2020). No entanto, sua rápida expansão e intensificação criou uma pressão que fez surgir várias doenças com grande diversidade de patógenos (Wendover et al., 2011).

Para tratar o surgimento desses patógenos e infecções bacterianas em peixes, utiliza-se substâncias antimicrobianas em grande escala em aquicultura (OMS, 2006), contudo, o uso excessivo de antimicrobianos têm contribuído para o surgimento de patógenos resistentes (Chiesa et al., 2018). Estudos revelaram que genes e bactérias resistentes a antimicrobianos são transferidos de animais de criação para humanos (O'Neill, 2015). Além disso, o uso constante de

antibióticos pode influenciar negativamente o meio ambiente, contribuindo para a poluição aquática devido aos resíduos gerados (Zhong et al., 2018). Portanto, métodos alternativos para prevenção e controle de doenças utilizando fitoterápicos tem sido constantemente explorados (Brum et al., 2017).

A fitoterapia vem sendo cada vez mais utilizada como método profilático e de tratamento alternativo para a aquicultura, devido à capacidade dos produtos vegetais de promoverem efeitos antibacterianos ou por atuarem como imunoestimulantes (Reverter et al., 2014). Estudos mostraram os efeitos benéficos de ervas secas inteiras (Espírito Santo et al., 2019), extratos de ervas (Baldissera et al., 2018) e óleos essenciais (Brum et al., 2018a; Silva et al., 2019; Souza et al., 2019) sobre o desempenho de crescimento, atividade imunológica e resistência a doenças contra vários patógenos em vários peixes de criação, incluindo a tilápia do Nilo (Aguinaga et al., 2015; Aguinaga et al., 2016; Melo et al., 2013). Além disso, óleos essenciais obtidos de produtos vegetais com atividades bactericida e antifúngica podem substituir o uso de quimioterápicos utilizados em piscicultura (Silva et al., 2019).

Dentre os fitoterápicos existentes, destaca-se o óleo de copaíba que é extraído de espécies de *Copaifera* encontradas na Amazônia e regiões centrais do Brasil, compostas por aproximadamente 25 espécies, sendo as mais abundantes as espécies *C. langsdorffii*, *C. guianensis*, *C. multijuga*, *C. cearensis*, *C. officinalis*, *C. duckei*, *C. confertiflora* e *C. coriacea* (Veiga-Junior and Pinto, 2002; Leandro et al., 2012). O óleo de copaíba possui propriedades como efeito expectorante, diurético, antiparasitário e analgésico, além de atividades antibacterianas e anti-inflamatórias (Dos Santos et al., 2008; Gelmini et al., 2013; Trindade et al., 2013; Bonan et al. al., 2015).

O óleo de copaíba demonstrou atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* inibindo a migração de leucócitos para a cavidade pleural de ratos (Kobayashi et al., 2011), além de possuir atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes* (Pieri et al. ., 2010; Pieri et al., 2012). Na aquicultura, há descrições do uso do óleo de Copaíba, com efeitos positivos observados tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra parasitas monogenéticos e acantocéfalos em pacus, *Piaractus mesopotamicus* (Costa et al., 2017) e tambaquis, *Colossoma macropomum* (Valentim et al., 2018; Malheiros et al., 2020) com administração através de água por imersão ou exposição ao banho.

No entanto, não há estudos científicos publicados relativos à administração oral do óleo de copaíba, nem à sua atividade contra patógenos bacterianos de peixes.

Assim, apesar de sua grande atividade bacteriostática com potenciais propriedades anti-inflamatórias que podem auxiliar no tratamento de infecções bacterianas, informações sobre os efeitos da suplementação alimentar com óleo de copaíba sobre a saúde e resistência a doenças contra patógenos de peixes como *S. agalactiae* ainda não foram testadas. Assim, este estudo teve como objetivo verificar a atividade bactericida in vitro do óleo de copaíba contra dois principais patógenos de tilápia e se o aumento dos níveis dietéticos de óleo de copaíba comercial por 30 dias tem efeitos positivos antes e após a infecção experimental com *S. agalactiae* em tilápias do Nilo, avaliando o comportamento zootécnico desempenho, parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunológicos e histológicos após a infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Peixes e condições experimentais

O total de 420 juvenis de tilápia, sexualmente revertidas para machos, com comprimento médio $12,88 \pm 0,03\text{cm}$ e peso médio $37,55 \pm 0,62\text{g}$, foram obtidos de uma piscicultura comercial e aclimatados por 15 dias. Inicialmente, os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 15 tanques de fibra (250L / N=28), em cinco tratamentos (controle, 0,25% óleo de copaíba, 0,50% óleo de copaíba, 0,75% óleo de copaíba e 1,0 % óleo de copaíba) em triplicata e suplementados por 30 dias com óleo de Copaíba. Após esse tempo, os peixes foram redistribuídos aleatoriamente para o desafio experimental com *Streptococcus agalactiae* em seis tratamentos (controle PBS, controle bactéria, 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0%) em triplicata em 18 tanques de fibra (250L/N=10). Os tanques foram conectados a um sistema de água contínuo com aeração constante. Os tanques foram sifonados uma vez por semana e a qualidade da água permaneceu dentro da faixa de conforto para os peixes durante todo o experimento: oxigênio dissolvido = $6,4 \pm 0,1\text{mgL}^{-1}$, pH = $7,0 \pm 0,1$, condutividade elétrica = $199,6 \pm 2,6 \mu\text{Scm}^{-1}$, temperatura = $28,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$, amônia = $0,002 \pm 0,001 \text{ ppm}$ e nitrito = 0 ppm (Hein

e Brianese, 2004). O protocolo ético para este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentos com Animais (CEUA-004585/19), de acordo com as diretrizes para o cuidado e uso de animais de laboratório da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, Brasil.

Análises da composição química do óleo de copaíba

O óleo de Copaíba foi obtido comercialmente (Copaíba da Amazônia, Guarujá, Brasil). Um certificado de pureza foi emitido pela empresa para um Relatório de Análise sob o número 101374/101/001. O óleo foi extraído de *Copaifera duckei*. A composição química do óleo foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-MS) para compará-la com padrões autênticos disponíveis para compostos fixos, enquanto a fração volátil foi analisada por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas (GC/MS) de acordo com Silva et al. (2017).

Atividade *in vitro* do óleo de copaíba

A atividade bactericida do óleo de copaíba contra *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare* foi testada por um ensaio *in vitro* adaptado de Abdollahzadeh et al. (2014). Foram utilizadas cepas patogênicas isoladas de surtos da doença em *O. niloticus*; bactérias foram confirmadas por métodos bioquímicos e moleculares e foram usadas anteriormente em vários tipos de pesquisas envolvendo ensaios patogênicos (Cueva-Quiroz et al., 2020; Ramos-Espinoza et al., 2020a; Ramos-Espinoza et al., 2020b). Primeiramente, soluções bacterianas em fase logarítmica foram previamente preparadas e as doses padronizadas por meio de leituras espectrofotométricas em 540 nm para *S. agalactiae* e 600 nm para *F. columnare*. As doses foram preparadas diluindo colônias puras em tampão fosfato salino estéril (PBS) com densidade óptica (DO) = 0,160 para as cepas, as doses foram projetadas para atingir o crescimento bacteriano completo nas placas de ágar. Swabs estéreis foram usados para espalhar cada solução bacteriana em ágar Brain Heart Infusion (BHI, Kasvi, Brasil) para *S. agalactiae* e ágar G1-a para *F. columnare*. As placas foram mantidas em temperatura ambiente e após 5 minutos, um disco de papel filtro estéril (Whatman,

6 mm de diâmetro) foi aplicado na superfície central de cada placa, que foi previamente semeada. Em seguida, o óleo de copaíba, previamente filtrado (0,22 µm), foi aplicado pipetando 8 µ e 10 µ no centro dos discos; cinco réplicas. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos para secar e, em seguida, foram incubadas de cabeça para baixo a 30°C por 24-72h para avaliar o crescimento bacteriano. Um disco antibiótico de oxitetraciclina de 30 µg foi usado como controle positivo (Oxford, Hampshire, Reino Unido). Após a incubação, um paquímetro foi usado para medir os diâmetros de inibição bacteriana. O grau de inibição foi classificado como não inibido (-), levemente (+), parcialmente (++) ou completamente (+++) inibido.

Desenho experimental

Para análise do desempenho fisiológico e zootécnico, os peixes foram distribuídos nos grupos experimentais, delineados da seguinte forma: controle alimentado sem óleo de copaíba, óleo de copaíba 0,25%, óleo de copaíba 0,50%, óleo de copaíba 0,75% e óleo de copaíba 1,0% por 30 dias. Após o término do experimento alimentar, 21 peixes de cada grupo foram anestesiados em solução de benzocaína (100 mgL⁻¹), previamente dissolvida em álcool puro (Neiffer e Stamper 2009) para coleta de amostras de sangue. Sangue total foi usado para análise hematológica e burst respiratório, enquanto plasma foi usado para glicemia e amostras de soro foram usadas para análises bioquímicas e imunológicas. Por fim, amostras de tecido de cinco peixes por grupo experimental foram coletadas para análise histopatológica.

Para analisar o efeito do óleo na saúde dos peixes, os animais foram reorganizados para o desafio bacteriano e distribuídos aleatoriamente em 18 tanques de fibra (250 L), 10 peixes por tanque, em seis tratamentos em triplicata. Os grupos experimentais foram delineados da seguinte forma: controle PBS e controle bactéria correspondendo aos peixes alimentados sem óleo de copaíba, e outros quatro grupos suplementados com 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0% de óleo de copaíba por 30 dias. As concentrações foram definidas a partir de experimentos anteriores que mostraram que rações com concentrações de óleo de Copaíba superiores a 1% não foram bem toleradas pela tilápia (dados não apresentados).

O desenho experimental, considerando as concentrações e o tempo (dias) de suplementação foram determinados de acordo com experimentos anteriores envolvendo o teste de diversos óleos essenciais para peixes (Brum et al., 2017; Brum et al., 2018a; Baba et al., 2016). Após o teste de alimentação, a biometria de todos os peixes foi realizada e os próximos peixes dos grupos controle bactéria, 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0% foram desafiados com dose letal 50% (DL50%-21d) de uma cepa patogênica de *S. agalactiae* por via intraperitoneal (IP, 0,2 ml), enquanto os peixes do grupo PBS receberam o mesmo volume de tampão fosfato estéril (PBS, grupo controle) (Ramos-Espinoza et al., 2020). Vinte e quatro horas após o desafio, 21 peixes por tratamento foram anestesiados em solução de benzocaína (100 mgL⁻¹), previamente dissolvida em álcool puro (Neiffer & Stamper, 2009) para coleta de sangue para avaliação de parâmetros hematoimunológicos e bioquímicos. A sobrevivência cumulativa foi calculada 15 dias pós-desafio usando a fórmula (sobreviventes/total de peixes) *100 após 15 dias de desafio (Claudio et al., 2019).

Preparo da dieta

O preparo da dieta foi realizado conforme descrito por Skov et al. (2012) com modificações. Para cada 100g de ração basal foram adicionados 250 µL, 500 µL, 750 µL e 1000 µL de óleo de copaíba, misturando constantemente, correspondendo às concentrações de 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,00%, respectivamente. Em seguida, as misturas foram agitadas por 10 minutos e refrigeradas. A ração comercial (Nutripiscis TR 32, Paulínia, SP, Brasil) com 320g kg⁻¹ de proteína bruta, 120g kg⁻¹ de umidade, 60g kg⁻¹ de extrato etéreo e 55g kg⁻¹ de fibra bruta foi utilizada como dieta basal. Durante o período experimental de alimentação, a ração foi fornecida a 5% do peso corporal, três vezes ao dia.

Desempenho zootécnico

Para avaliação do crescimento e desempenho zootécnico das tilápias, calcularam-se os parâmetros abaixo de acordo com o peso inicial e final dos peixes de cada etapa experimental:

- Ganho de peso dos peixes (GP):
 - $GP (g) = \text{Peso médio final} - \text{Peso médio inicial}$
- Ganho de peso diário dos peixes (GDP):
 - $GPD (g) = GP / \text{número de dias do experimento}$
- Conversão alimentar aparente (CA):
 - $CA: \text{Alimento consumido (g)} / \text{ganho de peso (g)}$
- Biomassa final (BF):
 - $BF (g) = \text{Peso médio final (g)} \times \text{Número de peixes analisados}$

Amostragens sanguíneas

Trinta dias após a suplementação, os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína (100 mgL^{-1}), previamente dissolvida em álcool puro (Neiffer & Stamper, 2009), para coleta de amostras de sangue. O total de 21 peixes por tratamento foram usados para coletar sangue. O sangue foi retirado de sete peixes por punção caudal com seringas de 1 mL contendo EDTA 10% atuando como anticoagulante, uma porção foi utilizada imediatamente para avaliação do burst respiratório e parâmetros hematológicos (contagem total e diferencial de leucócitos e extensão sanguínea), enquanto o restante foi centrifugado em eppendorfs de 1,5 mL a 5000g por cinco minutos para obtenção do plasma e verificação de glicose. Enquanto isso, os 14 peixes restantes foram usados para obter amostras de soro usando seringas de 1 mL sem anticoagulantes. As amostras foram deixadas coagular por uma hora, centrifugadas a 5000g por 5 minutos e armazenadas a -80°C para posterior análise bioquímica e imunológica. Para os peixes desafiados após 24 horas, a amostragem foi realizada com um total de 21 peixes e processados como segue acima.

Parâmetros hematológicos

A contagem total de hemácias (RBC, 10^6 mm^3) foi numerada diluindo o sangue fresco coletado com anticoagulante em solução de Nat Herrick (1:200) e realizada em câmara de Neubauer sob microscopia de luz. As contagens diferenciais, totais de leucócitos (leucócitos, 10^6 mm^3), trombócitos e leucócitos totais foram abordadas em duplicata, pelo método indireto de esfregaços sanguíneos corados com May-Grünwald-Giemsa-Wright e analisados por

microscopia de luz (Hrubec e Smith, 2000). A avaliação do hematócrito (Htc %) seguiu o método do microhematócrito. A avaliação da concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada de acordo com o método da cianometahemoglobina. Índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) também foram avaliados (Ranzani-Paiva et al., 2013).

Parâmetros bioquímicos

Foram realizadas análises de proteínas totais (PT), albumina, colesterol total (CT), colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade), triglicerídeos (TG), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) (Brito et al. ., 2015). As globulinas totais foram calculadas da seguinte forma: Globulinas (g dL^{-1}) = proteína total – albumina. Para glicose plasmática, 10 μL de água deionizada (em branco), plasma padrão ou não diluído foram pipetados em cubetas de plástico e 1 mL de reagente colorido foi adicionado a cada uma das cubetas. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro a 405 nm e comparada com o padrão. A glicose plasmática foi dosada por um colorimétrico enzimático.

Parâmetros imunológicos

Atividade de burst respiratório

As amostras de sangue dos peixes foram coletadas para determinação do burst respiratório dos fagócitos circulantes (ANDERSON e SIWICKI, 1995; CASTRO et al., 2014). Com base na metodologia da determinação das espécies reativas de oxigênio produzidas pelo “burst” oxidativo no ensaio colorimétrico, quantificou-se a redução do corante nitrobluetetrazolium (NBT) que forma precipitados de material insolúvel, azul escuro no interior do fagócito que são denominados grânulos de formazan (BILLER-TAKHASHI et al., 2013).

Para cada 100 μL de sangue heparinizado, adicionou-se 100 μL do corante nitrobluetetrazolium (NBT, Sigma, ST Luis, MO, USA) e 100 μL de PMA 10^{-5} (Forbol-12-Miristato-13-Acetato, 99% - 1mg). Incubou-se esta mistura por 30

minutos em temperatura ambiente e centrifugou-se a 300g por 5 minutos. Com isso, o corante NBT foi reduzido e o DMF (N, N- dimetilformamida - Sigma-Aldrich®) promoveu a lise da parede celular dos leucócitos e solubilizou os grânulos de formazan. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Único 2100) no comprimento de onda de 540 nm (SAHOO et al., 2005; CUEVA-QUIROZ et al., 2020).

Atividade de lisozima

As amostras de soro foram inativadas em banho-maria durante 30 minutos a 56 °C para inativar as proteínas do sistema complemento, a fim de que a lisozima fosse o único fator responsável pela lise do *Micrococcus lysodeikticus*. Foram diluídos 1 mg/mL de lisozima de clara de ovo em 10 µL de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2) e seguidamente da diluição de 10 µL deste preparo em 990 µL de tampão fosfato de sódio. Finalmente, 500 µL desta solução foram misturados com 4550 µL de tampão (concentração final 1 ng/µL ou 40 U/µL) e, a partir desta foram feitas as soluções de trabalho de lisozima nas concentrações de 40, 80, 160, 240, 320 e 400 µL. A suspensão de *M. lysodeikticus* foi preparada com base na diluição de 0,008 g da bactéria em 40 mL de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2). Diluiu-se 175 µL de soro inativado em 340 µL de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2) que foram colocados em triplicatas (150 µL por poço) em leitor de microplacas (Biochrom LTD, modelo Ez Read 2000, Massachusetts, USA) e completados adicionando-se a suspensão de 150 µL de *M. lysodeikticus* para obter o volume final de 300 µL por poço. Após isso, avaliou-se a redução da densidade óptica (ΔDO) em leitor de microplacas (Biochrom LTD, modelo Ez Read 2000, Massachusetts, USA) entre 450 nm e 550 nm durante 15 minutos com leitura a cada 5 minutos a 26°C. Na concentração de lisozima ($\mu\text{g/mL}^{-1}$), uma unidade corresponderia a redução de 0,0001 ΔDO para cada volume de amostra avaliado (ABREU et al., 2009; DEVADASON, 2018; BILLER et al.; 2021).

Atividade de mieloperoxidase (MPO)

Amostras de 25 µL de soro, sem inativar, foram diluídas em 125 µL de solução salina de Hanks (HBSS) sem Ca^{2+} e Mg^{2+} nas placas de 96 poços. O

substrato fresco de MPO foi preparado com concentrações de 50 µL de 20 mM 3, 3', 5, 5', adicionando-se cloridrato de tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) e 50 µL de 5 mM H₂O₂ (peróxido de hidrogênio). A amostra foi incubada em temperatura ambiente durante 2 minutos para a reação da alteração de cor. Após esse tempo, a reação de cor foi pausada adicionando-se 50 µL de ácido sulfúrico 4M (H₂SO₄) para leitura da densidade óptica em leitor de microplacas a 450 nm. Analisou-se as amostras-padrão sem soro e a unidade de atividade de MPO foi definida como 1µmol de H₂O₂ reduzida para cada microlitro de soro a 30°C de temperatura (QUADE e ROTH, 1997; CORDERO et al., 2016).

Atividade bactericida do soro

Preparou-se uma suspensão bacteriana de *S. agalactiae* em BHI agar na concentração de 1.7×10^8 CFU mL⁻¹ com densidade óptica de 0,140 lida em comprimento de onda de 540 nm. Em placas de fundo U, adicionou-se 60 µL de soro de peixes em duplicata e 60 µL de suspensão de *S. agalactiae*. Como controle utilizou-se PBS estéril. Em seguida a placa foi incubada por 1h a 25°C e, após esse período, 100 µL da solução de cada poço foram dispensadas individualmente em placas de ágar, espalhadas uniformemente por alças de Drigalski e encubadas por 48 horas em estufa. A atividade lítica do soro foi realizada por meio da contagem do número de colônias formadas ao final de 48h e a leitura feita com base no cáclulo da porcentagem de colônias inibidas (ALY et al., 2008; CAIPANG et al., 2008; BILLER-TAKAHASHI et al., 2013).

Histologia e histomorfometria

Fragmentos de fígado, baço e intestino de cinco peixes de cada tratamento foram coletados após 30 dias de suplementação para análises histológicas. Os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína (100 mgL⁻¹) seguido de secção medular. Os fragmentos foram fixados em formol tamponado por 24h e posteriormente preservados em álcool 70%. As amostras foram processadas por meio de técnicas histológicas convencionais, por desidratação gradual em álcool 70-100%, clareamento em xileno e inclusão em parafina. Cortes de cinco microns de espessura foram realizados usando um micrótomo (Slee, Mainz, Alemanha) e depois corados com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram examinadas com um microscópio de luz (BX51, Olympus, Tóquio, Japão) com câmera digital

(DP72, Olympus). As medições e contagens de tecidos foram realizadas usando o pacote de software CellSens Standard 1.5 (Olympus).

Com relação à análise histomorfométrica do intestino, foram tomados cinco vilos por lâmina em diferentes campos (cinco lâminas por grupo) total e lidas em lente objetiva com aumento de 20X em microscópio óptico (Olympus BX51 com DP72 câmera digital e CellSens Standard 1.5 software package- Olympus Corporation, Tokyo, Japan) para as medições das vilosidades intestinais e para contagem de células caliciformes. O comprimento começou da musculatura da mucosa e terminou no epitélio de revestimento no ápice do vilo. A medida do largo foi realizada na metade do vilo do epitélio de revestimento até o outro epitélio de revestimento. No baço foi realizada a contagem de centros melanomacrófagos considerando 5 campos diferentes e no fígado foi realizada microscopia para ver se o óleo causava algum tipo de lesão.

Análises estatísticas

O software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, EUA) foi utilizado para a análise estatística. Os dados foram testados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene). Em seguida, foram submetidos a ANOVA one-way ou teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Quando diferenças significativas foram encontradas, o teste de Tukey ou o teste de comparação múltipla de Dunn foram aplicados. As curvas de sobrevivência foram avaliadas pelos testes de Kaplan-Meier e Log-rank.

RESULTADOS

Composição do óleo de copaíba

Na porção fixa do óleo de copaíba, foram identificados diterpenos como ácido copálico ($C_{20}H_{32}O_2$), ácido harwicko ($C_{20}H_{28}O_3$), ácido 3 β -hidroxycopálico ($C_{20}H_{32}O_3$), ácido enta-agálico ($C_{20}H_{30}O_4$), ácido ent-agático-metil-éster-15 ($C_{21}H_{32}O_4$) e ácido 3 β acetocopálico ($C_{22}H_{34}O_4$). Na fração volátil do óleo, foram identificados 13 componentes, sendo o β cariofileno (44%) e o α bergamoteno (20.93%) os mais evidentes na amostra (Tabela 1).

Tabela 1. Composição da fração volátil do óleo de copaíba *C. ducke*.

Compostos	Tempo de retenção	Conteúdo (%)
α cubebene	27.66	1.01
α copaene tricyclo	28.84	6.18
β caryophyllene	30.89	44.00
Trans- α -bergamotene	31.45	20.93
α humulene 1,4,8 cycloundecatriene 2,6,6,9-tetramethyl	32.17	8.51
Cadinene- γ -naphthalene	33.05	1.01
germacrene-D	33.26	2.73
β farnesene E dodeca-triene	33.35	0.93
Bisabolene- β -cyclohexene	34.32	6.32
cubenol 1-isopropyl-4,7-dimetyl-1,3,4,5,6,8a-hexahydro	34.59	1.19
Cadidiene- δ -naphthalene	34.92	3.99
cis- α -bisabolene	35.63	0.86
germacrene-B	36.26	2.35
Total		100.00

Atividade bactericida do óleo de copaíba contra *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare*

O óleo de copaíba nas concentrações de 8 μ L e 10 μ L apresentou atividade bactericida para *S. agalactiae* com formação evidente de halo nas dimensões de $2,5 \pm 1,0$ cm e $3,15 \pm 0,2$ cm, respectivamente, ao redor dos discos após 48 horas (Figura 1). O crescimento da bactéria *F. columnare* foi totalmente inibido nas concentrações de 8 μ L e 10 μ L após 48 horas (Figura 1).

Com relação a classificação do grau de inibição, o óleo de copaíba nas concentrações avaliadas foi capaz de inibir parcialmente (++) o crescimento de *S. agalactiae* e totalmente (+++) a *F. columnare* (Tabela 2).

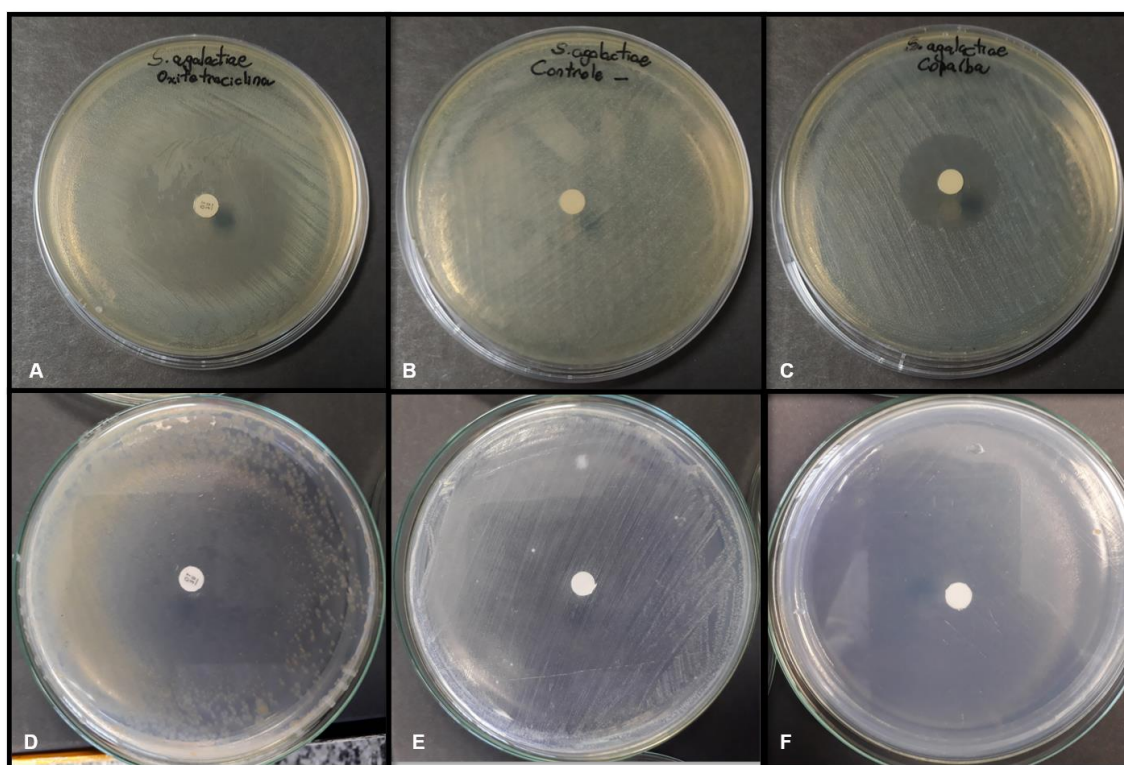


Figura 1. Resposta in vitro de *Streptococcus agalactiae* (A, B e C) e *Flavobacterium columnare* (D, E e F) após 48h. A e D. Controle antibiótico. B e E. Controle sem tratamento . C e F. 10µL de óleo de copaíba.

Tabela 2. Classificação da atividade bactericida do óleo de copaíba *in vitro*.

Bactéria	Inibição
<i>Flavobacterium columnare</i>	+++
<i>Streptococcus agalactiae</i>	++

(-) sem inibição; (+) levemente; (++) parcialmente; (+++) totalmente inibido

Desempenho zootécnico

Após 30 dias de alimentação, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos para nenhum parâmetro produtivo antes e após o desafio (Tabela 3).

Tabela 3. Médias do desempenho zootécnico de tilápias suplementadas com óleo comercial de copaíba por 30 dias (antes e após desafio por *S. agalactiae*)

Parâmetros	30 dias de suplementação com óleo comercial de copaíba				
	0%	0.25%	0.50%	0.75%	1.00%

PI (g)	38.28±1.74	38.41±2.57	36.54±0.86	37.87±0.11	36.64±0.62	
PF (g)	81.96±4.23	79.24±2.36	79.81±1.56	77.88±1.00	75.83±1.82	
GP (g)	43.67±3.21	40.83±2.44	43.27±2.42	40.0±1.05	39.19±1.89	
TI (cm)	12.97±0.13	10.01±0.11	10.03±0.15	10.16±0.11	10.20±0.25	
TF (cm)	16.09±0.20	15.76±0.30	15.93±0.13	15.71± 0.09	15.43±0.14	
TCE %	2.54±0.07	2.42±0.10	2.60±0.08	2.40±0.02	2.42±0.05	
IR (g)	40.49±2.65	38.06±1.56	39.75±2.47	39.40±1.27	42.37±0.84	
TCA	1.49±0.13	1.43±0.08	1.58±0.08	1.34±0.09	1.42±0.06	
Sobrevivência	100%	100%	100%	100%	100%	
24 horas após desafio po <i>S. agalactiae</i>						
Parâmetros	PBS	Bactéria	0.25%	0.50%	0.75%	1.00%
PI (g)	35.37±2.95	35.60±0.55	35.67±1.55	35.43±2.69	35.33±0.63	35.04±1.78
PF (g)	62.53±3.09	64.45±2.60	62.25±4.74	67.81±2.77	67.14±6.59	67.87±2.52
GP (g)	27.17±1.60	28.84±3.15	29.57±4.30	33.27±5.33	31.81±5.97	32.83±4.25
TI (cm)	10.04±0.14	10.32±0.20	10.53±0.15	10.09±0.16	10.19±0.20	10.14±0.14
TF (cm)	12.26±0.15	12.19±0.23	12.21±0.15	12.78± 0.15	12.02±0.54	12.71± 0.17
TCE %	1.91±0.15	1.97±0.18	1.84±0.24	2.18±0.39	2.11±0.27	2.21±0.29
IR (g)	37.12±1.78	37.39±0.33	37.47±0.93	37.21±1.63	37.1±0.38	36.79±1.07
TCA	1.37±0.12	1.30±0,05	1.41±0,03	1.15±0,15	1.17±0,14	1.12±017
Sobrevivência	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Valores (media±DP) com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes entre grupos ($p < 0.05$). PI (peso inicial), PF (peso final), GP (ganho de peso), TI (tamanho inicial), TF (tamanho final), TCE (taxa de crescimento específico), IR (ingestão de ração), TCA (taxa de conversão alimentar).

Parâmetros hematológicos

No eritrograma dos peixes suplementados por 30 dias, observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da Hb a 1,0% em relação ao controle (Tabela 4). A CHCM foi maior no óleo de Copaíba 1,0% do que todos os outros grupos, exceto o grupo 0,25%, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$). O leucograma mostrou aumento de leucócitos e redução de trombócitos ($p < 0,05$) nos grupos suplementados em relação ao controle após 30 dias de suplementação. Da mesma forma, foram observadas aumento de linfócitos e monócitos entre os tratamentos em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Nos peixes após o desafio de 24h, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em CGV, Htc, Hb, VCM, HCM e CHCM (Tabela 4). Por outro lado, observou-se redução de monócitos entre todos os tratamentos suplementados com óleo de copaíba após desafio em relação ao controle bactéria ($p < 0,05$). Os demais leucócitos e trombócitos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) com o controle bactéria nas contagens totais ou diferenciais

após o desafio. Apenas o grupo controle PBS apresentou mais leucócitos que os tratados.

Tabela 4. Valores de média e análise de variância para eritrograma de *O. niloticus* suplementadas com óleo de copaíba por 30 dias antes e após desafio por *S. agalactiae*.

30 dias após suplementação com óleo de copaíba						
		0%	0.25%	0.50%	0.75%	1.00%
CGV (10^6 mm^{-3})		1.84 ± 0.07	1.72 ± 0.06	1.90 ± 0.11	1.91 ± 0.09	2.06 ± 0.10
Htc (%)		30.43 ± 0.92	28.79 ± 0.83	29.29 ± 0.54	30.29 ± 0.59	29.29 ± 0.94
Hb (g dL ⁻¹)		5.84 ± 0.31^B	6.74 ± 0.15^{AB}	6.73 ± 0.18^{AB}	6.55 ± 0.18^{AB}	7.18 ± 0.29^A
VCM (fL)		166.2 ± 5.99	169.1 ± 10.23	157.2 ± 8.41	161.2 ± 8.56	139.3 ± 6.93
HCM (pg)		31.85 ± 1.56	39.53 ± 2.12	36.02 ± 1.68	37.83 ± 1.75	35.60 ± 2.53
CHCM (g dL ⁻¹)		19.18 ± 0.70^C	23.44 ± 0.21^{AB}	22.98 ± 0.48^B	21.64 ± 0.27^B	25.44 ± 0.84^A
Leucócitos totais ($10^4 \text{ cel.}\mu\text{L}^{-1}$)		2.86 ± 0.14^B	5.06 ± 0.45^A	5.07 ± 0.49^A	5.16 ± 0.27^A	5.60 ± 0.28^A
Trombócitos totais ($10^4 \text{ cel.}\mu\text{L}^{-1}$)		4.81 ± 0.14^A	3.05 ± 0.19^B	3.10 ± 0.38^B	3.19 ± 0.13^B	3.30 ± 0.25^B
Linfócitos ($10^4 \text{ cel.}\mu\text{L}^{-1}$)		1.8 ± 0.08^B	3.00 ± 0.32^{AB}	3.87 ± 0.33^A	3.59 ± 0.20^A	3.89 ± 0.18^A
Monócitos ($10^4 \text{ cel.}\mu\text{L}^{-1}$)		0.78 ± 0.06^B	1.70 ± 0.09^A	1.45 ± 0.15^A	1.37 ± 0.07^A	1.14 ± 0.09^A
Neutrófilos ($10^4 \text{ cel.}\mu\text{L}^{-1}$)		0.27 ± 0.34^A	0.34 ± 0.06^A	0.19 ± 0.02^A	0.19 ± 0.03^A	0.25 ± 0.02^A
24 horas após desafio por <i>S. agalactiae</i>						
	PBS	Controle bactéria	0.25%	0.50%	0.75%	1.00%
CGV (10^6 mm^{-3})	1.95 ± 0.12	1.91 ± 0.10	1.86 ± 0.06	1.96 ± 0.08	2.05 ± 0.09	1.74 ± 0.06
Htc (%)	34.50 ± 1.48	31.79 ± 1.03	33.71 ± 1.17	32.50 ± 1.43	33.93 ± 0.49	33.93 ± 1.20
Hb (g dL ⁻¹)	7.34 ± 0.25	6.27 ± 0.16	6.13 ± 0.36	7.25 ± 0.19	7.05 ± 0.28	6.82 ± 0.46

VCM (fL)	178.52 ± 8.05	169.20 ± 12.33	181.70 ± 8.65	166.53 ± 7.51	159.90 ± 3.33	194.60 ± 4.03
HCM (pg)	38.16 ± 1.96	33.22 ± 1.84	33.01 ± 2.15	37.41 ± 2.08	34.89 ± 2.13	38.95 ± 1.62
CHCM (g dL ⁻¹)	21.36 ± 0.44	19.80 ± 0.48	18.23 ± 1.02	22.46 ± 0.71	20.85 ± 0.99	20.08 ± 1.01
Leucócitos totais (10 ³ cel.μL ⁻¹)	43.87 ± 4.16 ^A	17.97 ± 1.54 ^{AB}	15.65 ± 3.40 ^B	13.88 ± 2.07 ^B	16.05 ± 1.14 ^{AB}	13.45 ± 1.79 ^B
Trombócitos totais (10 ³ cel.μL ⁻¹)	40.10 ± 4.59 ^A	24.66 ± 4.18 ^{AB}	23.86 ± 2.26 ^{AB}	32.42 ± 3.31 ^A	24.83 ± 3.8 ^{AB}	15.57 ± 1.17 ^B
Linfócitos (10 ³ cel.μL ⁻¹)	26.04 ± 2.21 ^A	8.31 ± 1.10 ^B	7.47 ± 1.34 ^B	8.09 ± 0.37 ^B	9.60 ± 0.68 ^B	8.33 ± 1.23 ^B
Neutrófilos (10 ³ cel.μL ⁻¹)	8.71 ± 1.63 ^A	2.53 ± 0.57 ^{AB}	4.34 ± 1.87 ^{AB}	0.64 ± 0.04 ^B	2.70 ± 0.47 ^{AB}	2.11 ± 0.27 ^{AB}
Monócitos (10 ³ cel.μL ⁻¹)	9.11 ± 1.11 ^A	7.12 ± 0.80 ^A	3.85 ± 0.77 ^B	3.10 ± 0.12 ^B	3.74 ± 0.51 ^B	2.99 ± 0.37 ^B

Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes entre os grupos (p<0.05) segundo ANOVA e Teste de Tukey. CGV: Contagem de glóbulos vermelhos; Htc: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; VCM: Volume corpuscular medio; HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular media.

Parâmetros bioquímicos

Após 30 dias de suplementação, não foram observadas diferenças significativas (p > 0,05) em proteínas totais (PT), globulinas (G), colesterol total (CT), HDL, LDL, triglicérides (TG), enzimas AST e ALT e glicose (Tabela 5). O nível de albumina e a razão AG foram menores em 0,75% do que os demais grupos (p < 0,05). Por outro lado, 24h após a infecção, foram observadas alterações nos parâmetros bioquímicos. A proteína total (TP) do tratamento 0,25% foi menor (p < 0,05) e a albumina foi maior (p < 0,05) nos tratamentos 0,75% e 1,0% quando comparados ao tratamento controle desafiado. Os níveis de globulina foram menores nos infectados (p < 0,05) nos tratamentos 0,25% e 1,0% após o desafio e a relação A:G maior (p < 0,05) nos tratamentos 0,50%, 0,75% e 1,0% em relação ao controle bactéria. O colesterol total (CT), LDL e HDL foram maiores (p < 0,05) entre 0,50% e 0,75% em relação ao controle PBS. Por fim, TG elevados foram observados nos tratamentos 0,50% e 0,75% (P < 0,05) em relação ao controle bactéria.

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos de tilápias suplementadas com óleo comercial de copaíba por 30 dias antes e após desafio por *S. agalactiae*.

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos de tilápias suplementadas com óleo comercial de copaíba por 30 dias antes e após desafio por *S. agalactiae*.

30 dias após suplementação com óleo de copaíba						
	0%	0.25%	0.50%	0.75%	1.00%	
PT (g dL ⁻¹)	2.26± 0.31	2.41±0.17	2.42±0.30	2.29±0.11	2.39±0.29	
Albumina (g dL ⁻¹)	0.73±0.02 ^A	0.71±0.20 ^A	0.65±0.03 ^{AB}	0.57±0.01 ^B	0.69±0.01 ^A	
Globulina (g dL ⁻¹)	1.52±0.26	1.70±0.18	1.77±0.31	1.65±0.10	1.70±0.31	
A:G	0.48±0.02 ^A	0.42± 0.02 ^{AB}	0.38± 0.04 ^{AB}	0.34± 0.01 ^B	0.42± 0.03 ^{AB}	
CT (mg dL ⁻¹)	107.09±4.44	108.0±4.74	104.9±4.05	97.86±8.82	102.3±3.82	
HDL (g dL ⁻¹)	32.0±4.0	33.43±3.04	31.57±3.50	30.57±2.37	32.43±3.25	
LDL (g dL ⁻¹)	59.80±7.14	55.0±3.57	53.86±2.98	51.86±2.04	57.71±2.75	
TG (mg dL ⁻¹)	58.17±5.58	96.71±11.11	95.43±8.32	75.43±8.17	59.14±6.92	
AST (U L ⁻¹)	22.43±2.94	19.43±3.67	20.71±1.82	25.14±1.67	22.29±1.82	
ALT (U L ⁻¹)	141.7±36.25	169.1±45.23	184.7±28.28	142.9±28.45	171.7±28.46	
Glucose(mgdL ⁻¹)	79.61±4.56	78.57±5.48	77.67±5.13	79.71±6.66 ^A	79.37±6.46	
24 horas após desafio por <i>S. agalactiae</i>						
	PBS	Controle bactéria	0.25%	0.50%	0.75%	1.00%
PT (g dL ⁻¹)	3.15± 0.14 ^B	3.89±0.23 ^A	3.21±0.13 ^B	3.52±0.21 ^{AB}	3.51±0.17 ^{AB}	3.30±0.08 ^{AB}
Albumina (g dL ⁻¹)	0.74±0.02 ^B	0.64±0.10 ^B	0.95±0.11 ^{AB}	1.01±0.11 ^{AB}	1.04±0.05 ^A	1.05±0.07 ^A
Globulina (g dL ⁻¹)	2.41±0.13 ^{AB}	3.25±0.30 ^A	2.26±0.20 ^B	2.51±0.10 ^{AB}	2.47±0.13 ^{AB}	2.25±0.09 ^B
A:G	0.31±0.02 ^{AB}	0.22± 0.04 ^B	0.47± 0.12 ^{AB}	0.40± 0.03 ^A	0.42± 0.02 ^A	0.48± 0.05 ^A
CT (mg dL ⁻¹)	170.44±11.43 ^B	157.48±7.42 ^B	180.30±14.14 ^B	197.90±6.80 ^{AB}	241.91±10.66 ^A	226.29±9.87 ^A
HDL (g dL ⁻¹)	40.77±3.30 ^C	96.23±6.04 ^{AB}	90.67±5.60 ^{AB}	78.92±3.49 ^{BC}	126.66±5.49 ^A	95.81±5.49 ^{AB}
LDL (g dL ⁻¹)	13.64±2.40 ^C	32.85±4.81 ^{ABC}	23.73±3.92 ^{BC}	29.78±2.03 ^{ABC}	59.97±2.03 ^A	40.99±4.85 ^{AB}
TG (mg dL ⁻¹)	79.48±6.04 ^{AB}	48.47±5.98 ^B	58.76±3.99 ^{AB}	88.27±10.77 ^A	54.43±4.47 ^A	65.39±10.55 ^{AB}
AST (U L ⁻¹)	166.13±37.77	116.75±23.56	193.83±92.69	128.65±42.45	136.18±35.83	127.22±34.75
ALT (U L ⁻¹)	14.22±2.20	12.72±2.25	11.35±1.61	8.22±1.56	8.98±2.20	9.72±2.41
Glucose(mgdL ⁻¹)	98.90±8.85	119.2±9.97	120.0±13.17	97.16±11.24	100.1±10.63	105.9±15.38

Valores (média±DP) com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes entre grupos (p <0.05). PT- proteínas totais; CT- colesterol total; HDL- proteína de alta densidade; LDL- proteína de baixa densidade; TG- triglicérides; AST- aspartato aminotransferase; ALT- alanina aminotransferase.

Parâmetros imunológicos

A atividade de burst respiratório foi significativamente menor ($p < 0,05$) em 0,75% e 1,0% quando comparada ao controle após 30 dias de suplementação (Figura 2A). Não foi observada diferença significativa na atividade da lisozima ($p > 0,05$) (Figura 2C), enquanto a atividade da MPO foi significativamente menor ($p < 0,05$) a 0,75% em relação ao controle (Figura 2E). Nos peixes desafiados por *S. agalactiae* após 24 horas, não foram observadas diferenças significativas no burst respiratório (Figura 2B) e atividade da lisozima (Figura 2D) entre os tratamentos em relação ao controle bactéria. A atividade da MPO foi significativamente maior ($p < 0,05$) no tratamento 0,25% (T2) em relação ao controle bactéria (Figura 2F). Por fim, foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade bactericida sérica nos peixes após 30 dias de suplementação no tratamento 1,0% em relação ao grupo controle (Figura 3).

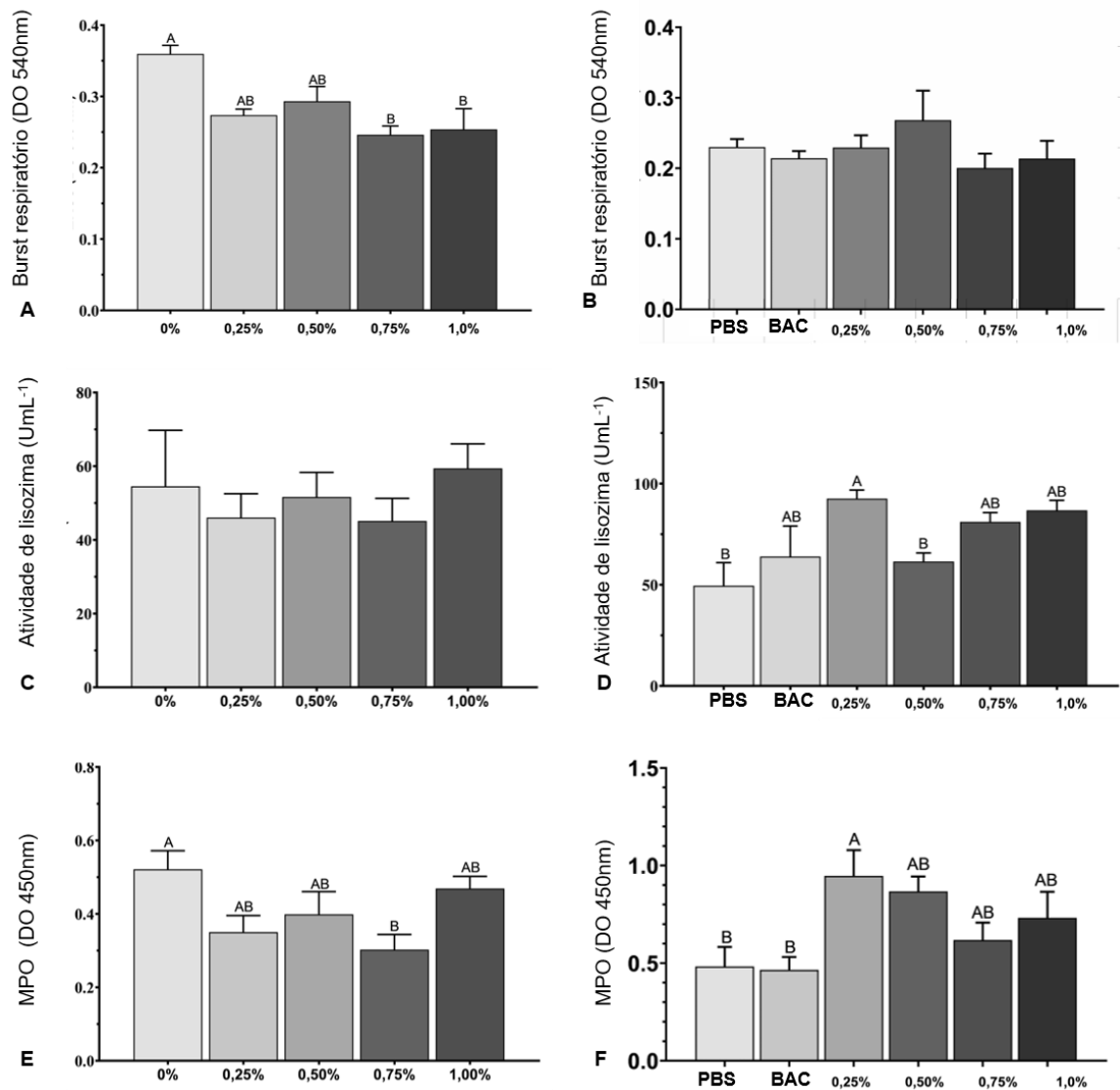


Figura 2. Parâmetros imunológicos de tilápias após suplementação com óleo de copaíba por 30 dias antes e após desafio por *S. agalactiae*. Valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos segundo Kruskal e Dunn pós -teste.

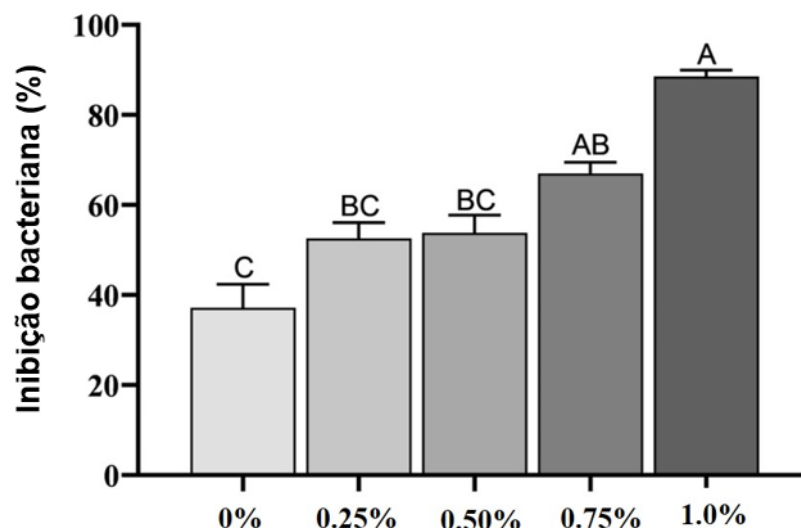


Figura 3. Atividade lítica do soro de tilápias após suplementação com óleo de copaíba por 30 dias. Valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos segundo Kruskal Wallis e Dunn pós-teste.

Sobrevivência cumulativa

Ao final do período experimental de 15 dias de infecção, os peixes infectados do controle bactéria, 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0% demonstraram sinais clínicos de infecção por *S. agalactiae* como exoftalmia, letargia, natação errática, natação em rodopios e exoftalmia. O percentual de sobrevivência cumulativa controle PBS e controle bactéria foram respectivamente, 100% e 30,16% (Figura 4). Nos tratamentos suplementados com 0,25% e 0,50% foram de 20,63% em cada um durante a sepse. Nos tratamentos 0,75% e 1,0% o percentual de sobrevivência foi de 14,46%, respectivamente. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos após 15 dias de desafio bacteriano.

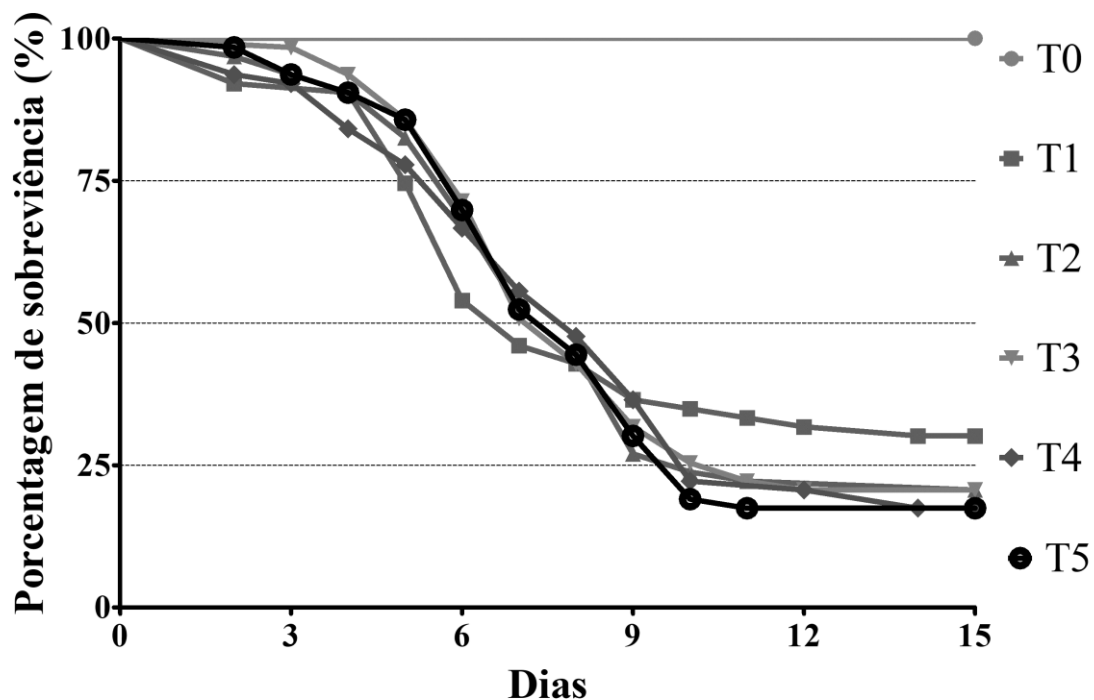


Figura 4. Sobrevivência cumulativa de tilápias 15 dias após desafio por *S. agalactiae*.

Histopatologia e histomorfometria

Na análise histopatológica dos tecidos, o fígado (Figuras 5A e 5B), baço (Figuras 5C e 5D) e intestino (Figuras 5E e 5F) dos peixes suplementados com óleo de copaíba, não foram verificadas alterações teciduais.

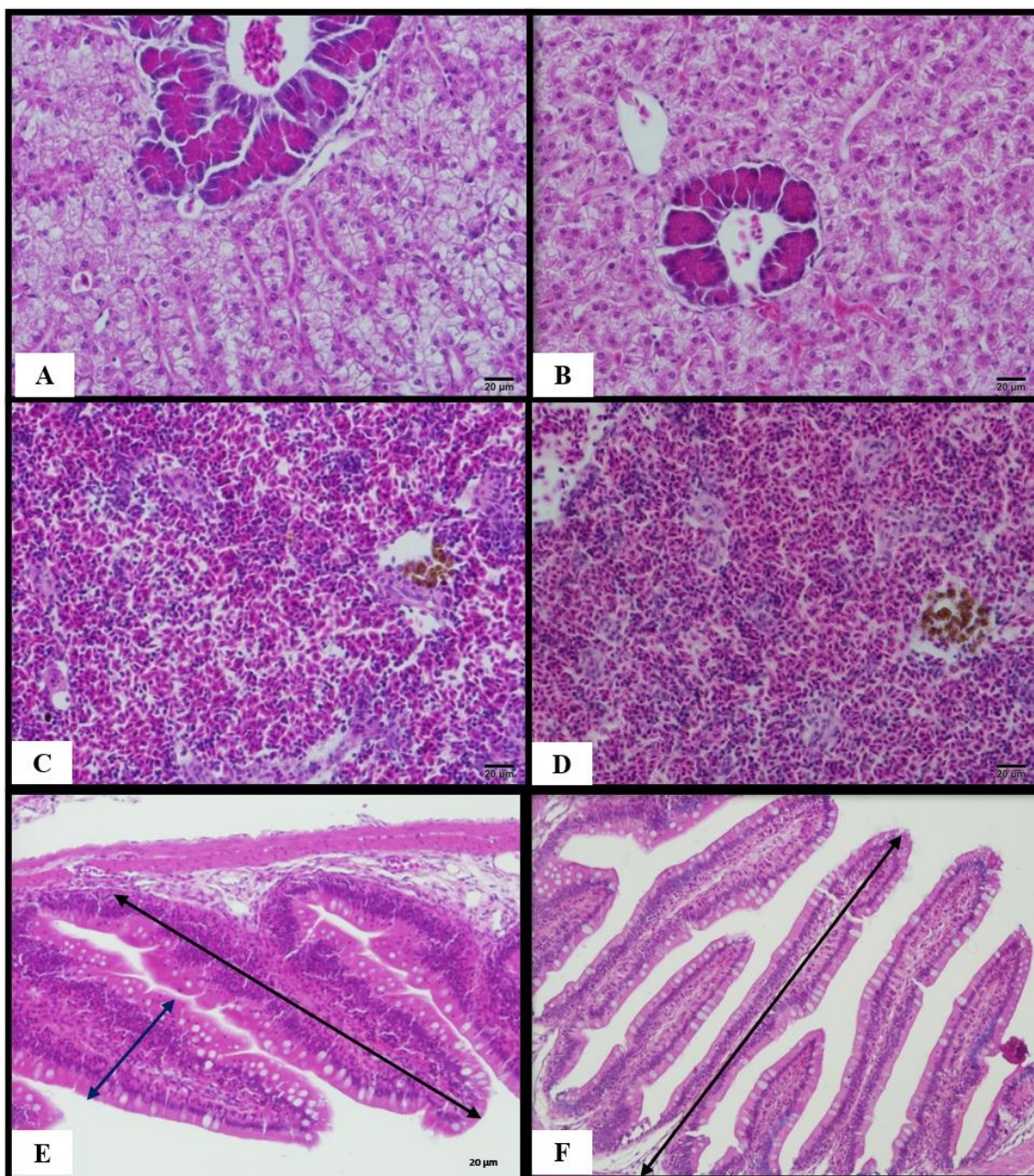


Figura 5. Histologia de tilápias após 30 dias de suplementação com óleo de copaíba. A. Fígado controle. B. Fígado 1.0%. C. Baço controle. D. Baço 1.0%. E. Intestino controle (seta azul: largura da vilosidade; seta preta: altura da vilosidade). F. Intestino 1.0%.. (Barra: 20 µm / Coloração H.E.).

Após 30 dias de suplementação com óleo de copaíba, foi constatado aumento significativo ($p < 0,05$) no comprimento das vilosidades intestinais das tilápias nos tratamentos 0,75% e 1,0% em relação ao controle (tabela 6). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na largura das vilosidades e na contagem de células caliciformes do intestino.

Com relação ao baço, não houve diferença significativa ($p>0,05$) na contagem de centros melanomacrófagos entre os tratamentos após 30 dias de suplementação com o óleo de copaíba (tabela 6).

Tabela 6. Histomorfometria intestinal e contagem de centro melanomacrófago do baço de tilápias suplementadas com óleo de copaíba por 30 dias.

Parâmetros	Controle	0.25%	0.50%	0.75%	1.0%
Comprimento da vilosidade (μm)	311.0 ± 13.54^B	344.9 ± 15.08^{AB}	369.6 ± 18.44^{AB}	400.0 ± 16.03^A	400.0 ± 11.93^A
Largura da vilosidade (μm) ^{NS}	98.42 ± 2.47	101.3 ± 3.24	101.5 ± 4.12	93.16 ± 3.31	100.6 ± 2.90
Número de células caliciformes ^{NS}	83.92 ± 7.27	94.16 ± 4.02	93.40 ± 2.60	97.32 ± 3.97	97.80 ± 3.18
Centro melanomacrófago do baço ^{NS}	2.40 ± 0.17	2.44 ± 0.02	2.44 ± 0.16	2.44 ± 0.17	2.44 ± 0.13

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5%.
NS- não significativo.

Nas análises histopatológicas realizadas nos peixes após desafio bacteriano, foram identificadas no fígado lesões de gravidade severa como esteatose, picnose, desarranjo cordonal e congestão dos sinusóides (Figura 6B e 6C; Tabela 7). Entretanto, foi observada necrose moderada nos peixes desafiados e suplementados em 0,25%, 0,50% e 0,75% e nenhuma necrose foi evidenciada no fígado no tratamento 1,0% após desafio (Tabela 7). No tecido esplênico dos animais desafiados com *S. agalactiae*, foram observados agregados de centros melanomacrófagos em formato nodular (Figura 6E e 6F). Todavia, no intestino, foi observada necrose moderada no controle bactéria (Figura 6H; Tabela 7), 0,25% e 0,50%. Porém, nos peixes desafiados que anteriormente receberam as

concentrações de 0,75% e 1,0% de copaíba, a necrose observada foi de grau leve (Tabela 7).

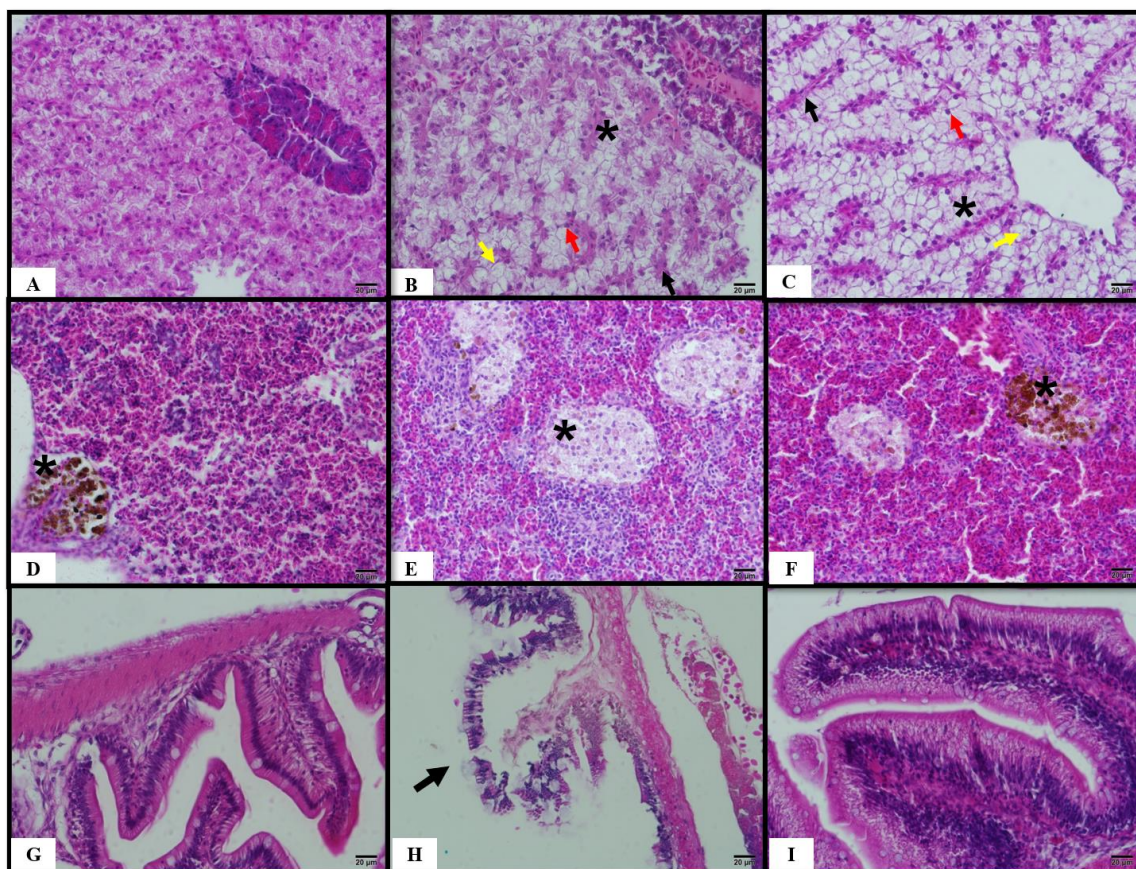


Figura 6. Histologia de tilápias após 15 dias de desafio. **A.** Fígado controle PBS. **B.** Fígado controle bactéria com esteatose (seta amarela), picnose (seta vermelha), desarranjo cordonal (asterisco) e congestão dos sinusóides (seta preta). **C.** Fígado 1.0% de óleo de copaíba após desafio bacteriano apresentando esteatose (seta amarela), picnose (seta vermelha), desarranjo cordonal (asterisco) e congestão dos sinusóides (seta preta). **D.** Baço controle com centro melanomacrófago em formato nodular (asterisco). **E.** Baço controle desafiado com centro melanomacrófago em formato nodular (asterisco). **F.** Baço 1.0% de óleo de copaíba após desafio com centro melanomacrófago em formato nodular (asterisco). **G.** Vilosidade intestinal controle. **H.** Vilosidade intestinal necrosada (seta preta) no controle desafiado. **I.** Vilosidade intestinal preservada em 1.0% após desafio bacteriano. (Barra: 20 μm / Coloração H.E.).

Tabela 7. Classificação das lesões histopatológicas identificadas em fragmentos de fígado, baço e intestino de tilápias após 15 dias de infecção por *S. agalactiae*.

Órgãos	Alterações	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Fígado	Congestão dos sinusóides	-	+++	+++	+++	+++	+++
	Desarranjo cordonal	-	+++	+++	+++	+++	+++
	Esteatose	+	+++	+++	+++	+++	+++
	Picnose	+	+++	+++	+++	+++	+++
	Necrose	-	++	++	++	++	-
Intestino	Necrose	-	++	++	++	+	+

(-) Ausente; (+) Leve; (++) Moderada; (+++) Severa

DISCUSSÃO

No presente estudo o óleo de copaíba não se mostrou tóxico para as tilápias nas concentrações testadas, evidenciado pela ausência de alterações clínicas ou comportamentais e por 100% de sobrevivência. Soma-se a essas evidências, que não foram verificadas alterações enzimáticas e/ou macroscópicas e microscópicas de toxicidade em fígado, baço e intestino nos peixes após período experimental. A toxicidade do óleo de copaíba para tilápias foi evidenciada em concentrações superiores à 25 mg.L⁻¹ (dados não apresentados). Estes achados de baixa toxicidade são compatíveis com os encontrados na literatura outros fitoterápicos em peixes teleósteos (YUNIS-AGUINAGA et al., 2015; MALHEIROS et al., 2020,) e outras espécies animais (TEIXEIRA et al., 2017).

Os peixes suplementados com óleo de copaíba nas concentrações 0,75 e 1,0% apresentaram aumento da vilosidade intestinal, assemelhando-se a outros óleos para mesma espécie (MOHAMED et al., 2014; VALLADÃO et al., 2017). Apesar disso, nas concentrações testadas, não foram observadas alterações nos parâmetros zootécnicos dos peixes. Outros fitoterápicos testados em teleósteos como hortelã (ADEL et al., 2015) e orégano (ABDEL-LATIF et al., 2020b) evidenciam alterações nos parâmetros zootécnicos, com doses superiores às empregadas neste estudo. Neste ensaio, as concentrações superiores a 1,1% do

óleo de copaíba reduziram a ingestão do pelete pelas tilápias em testes prévios de palatabilidade (dados não apresentados).

A atividade bactericida *in vitro* do óleo de copaíba foi verificada contra bactérias patogênicas *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare*. Foi constatada também, atividade bactericida do soro das tilápias contra cepas de *S. agalactiae*. Hoseinifar et al. (2020) observaram que o pó extraído de folhas de samambaia (*Adiantum capillus-veneris*) na concentração de 2,0% foi capaz de aumentar a atividade bactericida do soro de carpas contra *Aeromonas hydrophila* e *Yersinia ruckeri*.

A atividade bactericida do soro pode ser explicada devido a diversas moléculas presentes no soro, como a lisozima e proteínas do sistema complemento que tem capacidade de lisar paredes de células bacterianas (ROBERTS, 2012). Em associação a isso, temos o óleo de copaíba que possui β cariofileno na composição que interage com a parede celular bacteriana, danificando-a e reduzindo a capacidade de sobrevivência de bactérias (PIERI et al., 2012; PIERI et al., 2016; Tobouti et al., 2017; GARCÍA-BELTRÁN, et al., 2020). Corroborando com estes achados, estão outros estudos que comprovaram a atividade bactericida do óleo contra cepas de *Streptococcus* sp. (PIERI et al., 2012; MENDONÇA & ONOFRE, 2009; SIMÕES et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2016) e o presente trabalho que constatou atividade bactericida contra cepas patogênicas de *S. agalactiae*.

No entanto, não foi realizada análise para comprovar a presença de compostos químicos do óleo no sangue dos peixes suplementados, ou se o óleo comercial induz melhora de outros mecanismos imunes inatos que não foram testados, como o sistema complemento, provavelmente por não apresentarem alterações significativas na atividade de lisozima.

Observou-se, ainda, que o óleo de copaíba incrementou os valores de células de linfócitos e monócitos. Isto se dá porque dietas a base de óleos essenciais podem ajudar na saúde do animal e influenciar diretamente nos parâmetros relacionados à imunidade dos peixes (ABDEL-LATIF et al., 2020). Estudos demonstram a capacidade que óleos essenciais e produtos vegetais em aumentar a contagem de glóbulos brancos na ausência de estresse ou infecções (SILVA et al., 2019; VAN HAI et al., 2015; VALLEJOS-VIDAL et al., 2016). Estes estudos ainda associaram tais resultados à capacidade aprimorada de combate

às infecções e melhora no sistema imune dos peixes (SILVA et al., 2019; VAN HAI et al., 2015; VALLEJOS-VIDAL et al., 2016; SAKAI, 1999).

Além disso, foram constatadas alterações nos níveis de Hb e CHCM na concentração de 1,0% de óleo de copaíba com relação ao grupo controle. Tais alterações estão associadas ao tipo e à qualidade das dietas suplementadas com fitoterápicos oferecidas aos peixes, uma vez que influenciam diretamente nos parâmetros hematológicos desencadeando a formação de glóbulos vermelhos (MOSTAFA et al., 2009; SOARES et al., 2013; COSTA et al., 2017; SILVA et al., 2019; EBRAHIMI et al., 2020).

Ainda relacionado ao sistema imune, após suplementação com óleo de copaíba, os resultados constatarem baixa atividade de EROs nas dosagens 0,75% e 1,0% e MPO em 0,75%. Durante a atividade da espécie reativa de oxigênio, o peróxido de hidrogênio é utilizado para produzir ácido hipocloroso pela mieloperoxidase (MPO) que possui atividade antimicrobiana (DALMO et al., 1997).

O burst respiratório é resultado de espécies reativas de oxigênio produzidos por macrófagos e neutrófilos durante processos inflamatórios, sendo um mecanismo importante na resposta imune não específica de peixes infectados com patógenos (DENSEN, 1990; MIYAZAKI, 1998). O cariofileno presente na composição do óleo de copaíba reduz o estresse oxidativo e a inflamação sistêmica, influenciando diretamente na atividade de EROs e MPO (GHIZONI et al., 2017; AMES-SIBIN et al., 2018). Sendo assim, possivelmente o efeito antiinflamatório do óleo de copaíba pode ter exercido influência em tais parâmetros, ocasionando a redução dos mesmos.

Todavia, com base nos resultados positivos encontrados no presente estudo nos parâmetros relacionados ao sistema imune após a suplementação, assim como o forte indicativo de atividade bactericida do soro dos peixes contra *S. agalactiae* (Experimento II), desafiou-se outro grupo de peixes com esta cepa bacteriana para avaliar os efeitos em 24h, considerando que a resposta imune se inicia três horas após a entrada do patógeno no organismo (ABBAS et al., 2000; DELVES et al., 2016).

Embora não se constatarem alterações nas enzimas AST e ALT, na histopatologia dos peixes desafiados evidenciaram-se alterações em diferentes proporções, como a necrose de grau leve no intestino nas concentrações de

0,75% e 1,0%. Já no fígado, ausência de necrose foi observada nos peixes desafiados que receberam a concentração 1,0% de óleo de copaíba, confirmando o efeito antiinflamatório do óleo de copaíba.

Caputo et al. (2020) constataram por avaliações histopatológicas e histomorfométricas, a redução do infiltrado inflamatório no tecido pulmonar e na área do parênquima de camundongos asmáticos tratados com óleo de copaíba em 100 mg Kg⁻¹. Isso ocorre devido a alguns compostos presentes no óleo de copaíba como β cariofileno e α -humuleno que possuem propriedades antiinflamatórias e antioxidantes que auxiliam na redução da inflamação (FERNANDES et al., 2007; PIERI et al., 2009; CAVALCANTE et al., 2013; CAPUTO et al., 2020).

Entre os componentes, está o β cariofileno, por exemplo, que foi identificado em abundância na formulação comercial do óleo de copaíba utilizado no presente estudo, conforme mencionado. Ele é o principal sesquiterpeno encontrado em óleos essenciais e possui atividade antioxidante e anti-inflamatória (HORVÁTH et al., 2012). Esta molécula é efetiva contra hepatomegalias e contribui para a diminuição da atividade enzimática de marcadores hepáticos, além de aumentar a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (HARB et al., 2018). Todavia, baixas atividades enzimáticas de ALT e AST foram posteriormente associadas com a ação do β -cariofileno em ratos por meio da administração oral direta nas concentrações 30, 100 e 300 mg/kg após 4 semanas (HARB et al., 2018). Sendo assim, provavelmente os componentes do óleo poderiam ajudar na prevenção do estresse hepático, além de oferecer proteção em determinados órgãos importantes para sobrevivência dos peixes em processos de infecção induzida por *S. agalactiae*.

Os níveis de albumina tiveram aumento principalmente nas concentrações 0,75% e 1,0% em comparação ao controle sem suplementação, evidenciando o efeito antiinflamatório do óleo de copaíba; fato verificado no experimento antes do desafio, onde foi observado redução dessa proteína. Evidenciou-se também, aumento na relação albumina:globulina nos peixes desafiados e suplementados com 0,50%, 0,75% e 1,0%. Os resultados corroboram com os verificados em *Colossoma macropomum* desafiados com *Aeromonas hydrophila* suplementados com 1,0% do óleo essencial extraído do hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) (RIBEIRO et al., 2016) e, em trutas arco-íris

desafiadas com *Yersinia ruckeri* suplementação com óleo essencial extraído da casca da laranja (0,5 e 3,0 mL.kg⁻¹) (GÜLTEPE, 2020). A albumina é uma proteína a primeira proteína a migrar para foco inflamatório durante infecção, tida como proteína inflamatória de fase aguda negativa (MURATA et al., 2004; CLAUDIANO et al., 2013).

Da análise dos parâmetros sanguíneos, observou-se redução na contagem de monócitos nos tratamentos suplementados com relação ao peixes do grupo controle, provavelmente decorrente da efeito antiinflamatório que induz uma migração tráfego para o foco inflamatório pelo bloqueio dos mediadores inflamatórios (CLAUDIANO et al., 2013). Alterações similares foram observadas por Nugrahani et al. (2021) no peixe *Rasbora argyrotaenia* após 28h de infecção por *S. agalactiae*. Isto possivelmente acontece porque no início da resposta inflamatória, como o causado pela *S. agalactiae* em peixes, há aumento de células de defesa circulantes no sangue e com a evolução da inflamação, as células de defesa tendem a diminuir nos vasos e migram para o interstício por diapedese e são direcionadas por quimiotaxia até os tecidos acometidos (URIBE et al., 2011; ROBERTS et al., 2012; CLAUDIANO et al., 2013; DELVES et al., 2016; NUGRAHANI et al., 2021).

Sendo assim, comparando o ocorrido no presente experimento com aumento leucocitário observado em experimento anteriormente realizado com peixes sem desafio, sugere-se que o óleo de copaíba possa ter oferecido vantagem ao sistema imune aumentando a quantidade de células de defesa no sangue. Além disso, a monocitopenia foi causada por conta da migração de células inflamatórias para os tecidos com consequente redução das mesmas nos vasos.

Embora nenhuma diferença fosse observada entre os demais parâmetros sanguíneos que são indicadores importantes do estado imunológico do peixe (YARAHMADI et al., 2016), os resultados mostraram que não houve alteração na atividade de EROs ou lisozima. Apenas aumento de MPO na concentração de 0,25% em comparação ao controle. As atividades de EROs e MPO podem ser reduzidas devido a ação do cariofileno presente no óleo de copaíba que, por sua vez, contribui com a redução do estresse oxidativo e ocorre nos processos inflamatórios (GHIZONI et al., 2017; AMES-SIBIN et al., 2018).

Contudo, considerando a monocitopenia que seria indicativo de migração celular do vaso para o tecido, se houve essa migração de células de defesa, houve liberação de citocinas e, essas por sua vez, são mediadores químicos do processo inflamatório liberados pela degranulação de bactérias, juntamente com lisozima, contribuindo para o aumento também de EROs e MPO e que, por sua vez, são produtos da degradação bacteriana (ANDRADE et al., 1992; DELVES et al., 2016). Sendo assim, considerando que em situações de infecção esses parâmetros sofreriam aumento de valores de acordo com o proposto pela literatura e corroborando também com os achados de Ghizoni et al. (2017) e Ames-Sibin et al., (2018), provavelmente o óleo de copaíba possa ser benéfico no controle da resposta inflamatória e não acontecimento da sepse.

O lipidograma dos peixes desafiados com *S. agalactiae*, após 24h, mostrou triglicerídeos elevados nos tratamentos dos infectados e suplementados com 0,50% e 0,75% em comparação ao controle. O colesterol total, LDL e HDL foram observados em níveis elevados nos tratamentos 0,75% e 1,0% em relação ao controle. O colesterol e os triglicérides são importantes fontes de energia para os peixes (COZ-RAKOVAC et al., 2005).

O HDL age reduzindo o processo inflamatório e inibe a oxidação do LDL (ANSELL et al., 2005; TALL, 2008). Ribeiro et al. (2016) observaram aumento de colesterol em tambaquis suplementados com 0,5%, 1,0% e 1,5% do óleo essencial de hortelã-pimenta antes da infecção por *A. hydrophila*. Após a infecção, os autores constataram aumento neste parâmetro apenas no grupo infectado que não recebeu suplementação. Do mesmo modo, os triglicérides foram altos nas concentrações de 0,5% e 1,0% em peixes desafiados com esta bactéria (RIBEIRO et al., 2016). Desta forma, comparando os resultados do presente trabalho com os de Ribeiro et al. (2016), sugere-se que tais alterações aconteceram nesses parâmetros devido à suplementação com o óleo de copaíba.

Todavia, as tilápias desafiadas com *S. agalactiae* apresentaram sinais clínicos de natação errática, exoftalmia, letargia, petéquias e ascite. Todos os sinais evidenciados são compatíveis com a infecção causada por estreptococos (CHEN et al., 2012; BRUM et al., 2017).

Apesar da ação anti-inflamatória observada, não houve influência dos tratamentos com copaíba sobre o percentual de sobrevivência cumulativa dos peixes infectados após 15 dias. Em contrapartida aos resultados do presente

trabalho, é possível observar que outros tipos de óleos essenciais que agem como imunostimulantes, são capazes de causar diferentes efeitos na mortalidade e sobrevivência dos peixes em um curto período de suplementação (RAO et al., 2006). Brum et al. (2017) observaram baixa mortalidade no tratamento com óleo essencial de gengibre (0,5%) em tilápias suplementadas por 55 dias e infectadas por *S. agalactiae*. Do mesmo modo, Diler et al. (2017) evidenciaram redução no percentual de mortalidade de trutas-arco-íris suplementadas 90 dias com óleo essencial extraído do orégano (3.0 mg L⁻¹) após desafiar os peixes 30 dias com a bactéria *Lactococcus garviae*.

Com base nos resultados do presente estudo e dos achados em literatura, o óleo de copaíba nas concentrações preconizadas (0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0%) não ofereceu resistência às tilápias após infecção induzida por *S. agalactiae* em 15 dias. Os fatores contribuintes para isso poderiam ser a dosagem de óleo utilizada que foi baixa por conta da palatabilidade deste fitoterápico para as tilápias e, o tempo de suplementação de 30 dias com base no que se encontra na literatura (ACAR et al., 2015; BABA et al., 2016; DILER et al., 2017; AL-SAGHEER et al., 2018; SILVA et al., 2019, ABDEL-LATIF et al., 2020).

CONCLUSÃO

O óleo de copaíba possui atividade bactericida *in vitro* contra cepas patogênicas de *F. columnare* e *S. agalactiae*. A suplementação oral (30 dias) de tilápias *O. niloticus* nas concentrações de 0,75% e 1,0% melhora os parâmetros hematológicos, albumina e atividade lítica do soro. O óleo de copaíba não é tóxico para as tilápias nas concentrações preconizadas e contribui para o aumento das vilosidades intestinais, melhorando a superfície de absorção. Em processos infecciosos, apesar de não interferir no curso da infecção, o óleo de copaíba apresentou um efeito anti-inflamatório apresentando um efeito hepatoprotetor nas tilápias na concentração de 1,0%.

REFERÊNCIAS

Adel, M., Amiri, A.A., Zorriehzahra, J., Nematollahi, A., Esteban, M.A. 2015. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body

composition and hematological and immune parameters of fry Caspian whitefish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish and Shellfish Immunology* 45, 841-847. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.06.010>

Abdel-Latif, H.M.R., Abdel-Tawwab, M., Khafaga, A.F., Dawood, M.A.O. 2020. Dietary origanum essential oil improved antioxidative status, immunerelated genes, and resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish Immunology* 104, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.056>

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.004>

Aguinaga, J.Y., Claudiano, G.S.; Marcusso, P.F.; Manrique, W.G., Moraes, J.R.E., Moraes, F.R., Fernandes, J.B.K. 2015. Uncaria tomentosa increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology* 47, 630-638.

Aguinaga, J.Y., Fernandes Eto, S., Fernandes, D.C., Claudiano, G.S., Marinho Neto, F. A., Marcusso, P. F., Fernandes, J. B. K., Moraes, F. R., Moraes, J. R. E. 2016. Dietary camu camu, Myrciaria dubia, enhances immunological response in Nile tilapia. *Fish & Shellfish Immunology* 58, 284-291.

Alencar, E.N, Xavier-Junior, F.H., Morais, A.R., Dantas, T.R., Dantas-Santos, N., Verissimo, L.M., Rehder, V.L., Chaves, G.M., Oliveira, A.G., Egitol, A.S. 2015. Chemical characterization and antimicrobial activity evaluation of natural oil nanostructured emulsions, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15 (1), 880–888. <https://doi:10.1166/jnn.2015.9187>

Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ghareeb, A.A.A., Mohamed, M.F. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology* 25 (1), 128-136.

Araújo-Júnior, F.A., Marcelle, N. B., Neto, O.G.R., Costa, F.D'A., Brito, M.V.H. 2005. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cir Bras* 20, 93-99.

Baba, E., Acar, Ü., Öntas, C., Kesbiç, O.S., Yilmaz, S. 2016. Evaluation of *Citrus limon* peels essential oils on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture* 465, 13-18.

Baldissera, M.D., Souza, C.F., Zeppenfeld, C.C., Descovi, V.S.M., Santos, R.C.V., Baldisserotto, B. 2018. Efficacy of dietary curcumin supplementation as bactericidal for silvercatfish against *Streptococcus agalactiae*. *Microbial Pathogenesis* 116, 237–240.

Biller-Takahashi, J. D.; Takahashi, L. S.; Pilarski, F.; Sebastião, F. A.;Urbinati, E. C. Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity in pacu *Piaractus*

mesopotamicus (Holmberg, 1887), Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.65, n.6, p.1745-1751, 2013.

Biller, J. D.; Polycarpo, G. V.; Moromizato, B.S.; Sidekerskis, A.P.D.; Silva, T, D.; Reis, I. C.; Fierro-Castro, C. Lysozyme activity as an indicator of innate immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) when challenged with LPS and *Streptococcus agalactiae*. R. Bras. Zootec., v. 50, 2021. <https://doi.org/10.37496/rbz5020210053>

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

Bonan, R.F., Bonan, P.R.F., Batista, A.U.D., Sampaio, F.C., Albuquerque, A.J.R., Moraes, M.C.B., Mattoso, L.H.C., Glenn, G.M., Medeiros, E.S., Oliveira, J.E. 2015. In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly (lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. Materials Science and Engineering: C 48, 372-377. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.021>. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.021>

Brum, A., Cardoso, L., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L. 2018b. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture. <https://doi:10.1016/j.aquaculture.2018.02.040>

Brum, A., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Chagas, E. C., Chaves, F.C.M, Mourino, 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.020>

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

Caipang, C.M.A, Brinchmann, M.F., Kiron, V. 2008. Short-term overcrowding of Atlantic cod, *Gadus morhua*: effects on serum-mediated antibacterial activity and transcription of glucose transport and antioxidant defense related genes. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 151 (4), 560-565.

Cavalcante, R. 2013. Fitodontologia. 1. Ed. Rio Branco. 267pp.

Contreras-Zentella, M., Hernández-Muñoz, R., 2016. Is liver enzyme release really associated with cell necrosis induced by oxidant stress? Oxidative Med. Cell. Longev. 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/3529149>

Cordero H, Cuesta A, Meseguer J, Esteban MÁ. 2016. Changes in the levels of humoral immune activities after storage of gilthead seabream (*Sparus aurata*) skin mucus. Fish Shellfish Immunol 58, 500–507. <https://doi:10.1016/j.fsi.2016.09.059>

Costa, J.C.da, Valladão, G.M.R., Pala, G., Gallani, S.U., Kotzent, S., Crotti, A.E.M., Fracaroli, L., Silva, J.J.M.da, Pilarski, F. 2017. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus*

- mesopotamicus*. Aquaculture 471, 72–79.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.041>
- Coz-Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I., Hacmanjek, M., Topic-Popovic, N., Lipej, Z., Sostaric, B. 2005. Blood chemistry and histological properties for wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea. Vet. Res. Commun. 29, 677- 687.
- Cheng, C.-H., Yang, F.-F., Liao, S.-A., Miao, Y.-T., Ye, C.-X., Wang, A.-L., Tan, J.-W., Chen, X.-Y. 2015. High temperature induces apoptosis and oxidative stress in pufferfish (*Takifugu obscurus*) blood cells. Journal of Thermal Biology 53, 172-179.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.08.002>
- Chiesa L.M., Nobile, M., Malandra, R., Panseri, S., Arioli, F. 2018. Occurrence of antibiotics in mussels and clams from various FAO areas. Food Chemistry 240, 16–23.
- Cueva-Quiroz, V.A., Yunis-Aguinaga, J., Ramos-Espinoza, F.C., de Moraes, F.R., de Moraes, J.R.E. 2020. Acute hypercortisolemia inhibits innate immune parameters in *Piaractus mesopotamicus* experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 523, 735231.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735231>
- Dahham, S.S., Tabana, Y.M., Khadeer Ahamed, M.B., Abdul Majid, A.M.S. 2015. In vivo anti-inflammatory activity of β -caryophyllene, evaluated by molecular imaging. Molecules & Medicinal Chemistry, 1-6.
<https://doi.org/10.14800/mmc.1001>
- Dos Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Veiga, V.F., Pinto, A.C., Nakamura, C. V. 2008. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz 103 (3), 277–281. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000015>
- Espirito Santo, A.H., Brito, T.S., Brandão, L.L., Tavares, G.C., Leibowitz, M.P., Prado, S.A., Ferraz, V.P., Hoyos, D.C.M., Turra, E.M., Teixeira, E.A., Figueiredo, H.C.P., Leal, C.A.G., Ribeiro, P.A.P. 2019. Dietary supplementation of dry oregano leaves increases the innate immunity and resistance of Nile tilapia against *Streptococcus agalactiae* infection. Journal of the World Aquaculture Society, 1-19. <https://doi:10.1111/jwas.12602>
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. FAO yearbook. Fishery and aquaculture statistics. 2015/FAO annuaire. Rome.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.
- Fernandes, E.S., Passos, G.F., Medeiros, R., Cunha, F.M.da, Ferreira, J., Campos, M.M., Pianowski, L.F., Calixto, J.B. 2007. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. European Journal of Pharmacology 569, 228–236. <https://doi:10.1016/j.ejphar.2007.04.059>
- Fu, C., Cui, Y., Hung, S.S.O., Zhu, Z., 1998. Growth and feed utilization by F4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. J. Fish Biol.53, 115–129.

García-Beltrán, J.M., Mansour, A.T. Alsaqufi, A.S., Ali, H.M., Esteban, M.A. 2020. Effects of aqueous and ethanolic leaf extracts from drumstick tree (*Moringa oleifera*) on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, and their cytotoxic, antitumor, bactericidal and antioxidant activities. *Fish & Shellfish Immunology* 106, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.06.054>

Gelmini, F., Beretta, G., Anselmi, C., Centini, M., Magni, P., Ruscica, M., Cavalchini, A., Facino, R.M. 2013. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. *International Journal of Pharmaceutics* 440 (2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.021>

Gomes Dos Santos, E.C., Donnici, C.L., Camargos, E.R., Augusto de Rezende, A., Andrade, E.H., Soares, L.A., Farias, M.L.de, Roque de Carvalho, M.A., Almeida, M. 2013. Effects of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on the cell wall and cell division of *Bacillus cereus*, *J. Med. Microbiol.* 62 (Pt 7), 1032–1037.

Guimarães, A.L., Cunha, E.A., Matias, F.O., Garcia, P.G., Danopoulos, P., Swikidisa, R., Pinheiro, V.A., Nogueira, R.J. 2016. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera officinalis*) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) oils against staphylococcus aureus: importance in compounding for wound care, *Int. J. Pharm. Compd.* 20 (1), 58–62.

Hashimoto, G.S.O, Marinho Neto, F., 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.

Harb, A.A., Bustanji, Y.K., Abdalla, S.S. 2018. Hypocholesterolemic effect of β -caryophyllene in rats fed cholesterol and fat enriched diet. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 62 (3), 230–237. https://doi:10.3164/jcbn.17_3

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, 1-15. <https://doi:10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>

Hein, G., Brianese, R.H. 2004. Modelo emater de produção de tilapia. 27p.

Helal, R., Melzig, M.F., 2008. Determination of lysozyme activity by a fluorescence technique in comparison with the classical turbidity assay. *Pharmazie* 63 (6), 415–419. <https://doi.org/10.1691/ph.2008.7846>

Horváth, B., Mukhopadhyay, P., Kechrid, M., Patel, V., Tanchian, G., Wink, D.A., Gertsch, J., Pacher, P. 2012. β -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. *Free Radic Biol Med.* 52, 1325–1333. <https://doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.014>

Hoseinifar, S.H., Jahazi, M.A., Mohseni, R., Raeisi, M., Bayani, M., Mazandarani, M., Yousefi, M., Doan, H.D., Mozanzadeh, M.T. 2020. Effects of dietary fern (*Adiantum capillus-veneris*) leaves powder on serum and mucus antioxidant defence, immunological responses, antimicrobial activity and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology* 106, 959-966. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.09.001>

- Houston, A.H. 1990. Blood and circulation. In: Schreck C, Moyle B, editors. Methods in fishbiology. Bethesda (MD): American Fisheries Society, 273–334.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A. 2000. Hematology of fish. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., Schalm, O.W. Schalm's veterinary hematology. 5.ed. Philadelphia: London: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1120-1125.
- Isaacs, C.E., Litov, R.E., Thormar, H. 1995. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. Nutritional Biochemistry 6, 362-366.
- Kobayashi, C., Fontanive, T.O., Enzweiler, B.G., Bona, L.R., Massoni, T., Apel, M.A., Henriques, A.T., Richter, M.F., Ardenghi, P., Suyenaga, E.S. 2011. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. Pharmaceutical Biology 49 (3), 306–313. ISSN: 1388-0209
- Leandro, L.M., Vargas, F.S., Barbosa, P.C.S., Neves, J.K.O., Silva, J.A., Veiga-Junior, V.F. 2012. Chemistry and biological activities of terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. Molecules 17, 3866–3889. <https://doi.org/10.3390/molecules17043866>
- Lee, T.H., Qiu, F., Waller, G.R., Chou, C.H. 2000. Three new flavonol galloylglycosides from leaves of *Acacia confusa*. J. Nat. Prod. 63 (5), 710–712.
- Lee, Y.C., Yang, D., 2002. Determination of lysozyme activities in a microplate format. Anal. Biochem. 310 (2), 223–224. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00320-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00320-2)
- Malheiros, D.F., Sarquis, I.R., Ferreira, I.M., Mathews, P.D., Mertins, O., Tavares-Dias, M. 2020. Nanoemulsions with oleoresin of *Copaifera reticulata* (Leguminosae) improve anthelmintic efficacy in the control of monogenean parasites when compared to oleoresin without nanoformulation. Journal of Fish Diseases 43 (6), 687-695. <https://doi.org/10.1111/jfd.13168>
- Melo H., Moraes, J.R.E., Niza, I. G., [Moraes, F.R.](#), Ozorio, R., Shimada, M.T., Engracia Filho, J., Claudiano, G. S. . 2013. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso) v. 33, 724-730.
- Mendonça, D.E, Onofre, S.B. 2009. Antimicrobial activity of the oil-resin produced by copaiba *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae), Braz. J. Farmacogn. 19 (2B), 577–581.
- Metwally, M.A.A., 2009. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in Tilapia Nilotica (*Oreochromis niloticus*). World J. Fish Mar. Sci. 1, 56–64.
- Miyazaki, T. 1998. A simple method to evaluate respiratory burst activity of blood phagocytes from Japanese Flounder 33, 141–142.
- 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. <https://doi.org/10.3923/ijps.2014.602.610>
- Mostafa, A.A.Z., Ahmad, M.H., Mousallamy, A., Samir, A., 2009. Effect of using dried fenugreek seeds as natural feed additives on growth performance, feed

utilization, whole-body composition and Entropathogenic *Aeromonas hydrophila*-challenge of Monosex Nile Tilapia *O. niloticus* (L) Fingerlings. Aust. J. Basic Appl. Sci. 3, 1234–1245.

Nair, M.K.M., Joy, J., Vasudevan, P., Hinckley, L., Hoagland, T.A., Venkitanarayanan, K.S. 2005.

Antibacterial Effect of Caprylic Acid and Monocaprylin on Major Bacterial Mastitis Pathogens. J. Dairy Science 88, 3488-3495.

Neiffer, D.L., Stamper, M.A. 2009. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. ILAR 50 (4), 343-360. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.343>

Nelson, D.L., Cox., M.M. 2005. Principles of biochemistry. 4 ed. 119pp.

O'Neill, J. 2015. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. The review on antimicrobial resistance, 1-44.

Pieri, F.A., José, R.M., Galvão, J.N.N., Nero, L.A., Moreira, M.A.S. 2010. Antimicrobial activity of autoclaved and non-autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. Ciência Rural 40 (8), 1797-1801. ISSN 0103-8478.

Pieri, F.A., Mussi, M.C., Fiorini, J.E., Moreira, M.A., Schneedorf, J.M. 2012. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*, Braz. Dent. J. 23 (1), 36–38.

Pieri, F.A., Mussi, M.C., Moreira, M.A.S. 2009. Óleo de copaiba (*Copaifera sp.*): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. Ver Bras Plantas Med 11, 465-472.

Pieri, F.A., Souza, M.C., Vermelho, L.L., Vermelho, M.L., Perciano, P.G., Vargas, F.S., Borges, A.P., Veiga-Junior, V.F. da, Moreira, M.A. 2016. Use of beta-caryophyllene to combat bacterial dental plaque formation in dogs, BMC Vet. Res. 12 (1), 216. <https://doi:10.1186/s12917-016-0842-1>

Quade, M.J., Roth, J.A., 1997. Arapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. Veterinary Immunology and Immunopathology 58, 239–248.

Ramos-Espinoza, F. C., Cueva-Quiroz, V. A., Yunis-Aguinaga, J., Alvarez-Rubio, N. C., de Mello, N. P., & de Moraes, J. R. E. 2020b. Efficacy of two adjuvants administrated with a novel hydrogen peroxide-inactivated vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia fingerlings. Fish & Shellfish Immunology, 105, 350-358. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.051>

Ramos-Espinoza, F. C., Cueva-Quiroz, V.A., Yunis-Aguinaga, J., de Moraes, J. R. E. 2020a. A comparison of novel inactivation methods for production of a vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 735484. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735484>

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

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>

- Roberts, R.J. 2012. Fish Pathology. 4 ed. New Jersey: Blackwell, 593 p.
- Rodríguez, A., Esteban, M.Á., Meseguer, J. 2003. Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. Anat. Rec. Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology 272A (1), 415–423. <http://doi:10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.136717>
- Sahoo, P.K., Kumari, J., Mishra, B.K. 2005. Nonspecific immune responses in juveniles of Indian major carps. Journal of Applied Ichthyology 21,151-155. ISSN 0175–8659
- Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C., Nakamura, C.V. 2008. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus, Mem. J. 103 (3), 277–281.
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture 172, 63–92.
- Seixas, A.T.de, Gallani, S.U., Noronha, L.daS., Silva, J.J.M., Paschoal, J.A.R., Bastos, J.K., Valladão, G.M.R. 2020. *Copaifera* oleoresins as a novel natural product against acanthocephalan in aquaculture: Insights in the mode of action and toxicity. Aquaculture Research 51, 4681–4688. <https://doi:10.1111/are.14813>
- Silva, J.J.M.da, Crevelin, E.J., Carneiro, L.J., Rogez, H., Veneziani, R.C.S., Ambrósio, S.R., Moraes, L.A.B., Bastos, J.K. 2017. Development of a validated ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of acid diterpenes in *Copaifera* oleoresins. Journal of Chromatography A 1515, 81-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.038>
- Silva, L.T.S., Pereira, U.P., Oliveira, H.M., Brasil, E.M., Pereira, S.A., Chagas, E.C., Jesus, G.F.A., Cardoso, L., Mourino, J.L.P., Martins, M.L. 2019. Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of *Mentha piperita* after challenge with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture 506, 205-211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.035>
- Silva, M.T., Correia-Neves, M. 2012. Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems. Front. Immunol. 3, 1-6. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00174>
- Simões, C.A., Conde, N.C., Venancio, G.N., Milerio, P.S., Bandeira, M.F., Veiga Junior, V.F. da. 2016. Antibacterial activity of copaiba oil gel on dental biofilm, Open Dent. J. 10, 188–195.
- Skov, J., Kania, P.W., Holten-Andersen, L., Fouz, B., Buchmann. 2012. Immunomodulatory effects of dietary β -1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. Fish & Shellfish Immunology 33, 111-120. <https://doi:10.1016/j.fsi.2012.04.009>
- Soares, D.C., Portella, N.A., Ramos, M.F.S., Siani, A.C., Saraiva, E.M. 2013. Trans- β -Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.). Hindawi 2013, 13p. <https://doi.org/10.1155/2013/761323>
- Souza, E.M.de, Souza, R.C.de, Melo, J.F.B., Costa, M.M.da, Souza, A.M.de, Copatti, C.E. 2019. Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in

- Nile tilapia diet: growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. *Aquaculture* 504, 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.052>
- Tobouti, P.L., Martins, T.C.A., Pereira, T.J., Mussi, M.C.M. 2017. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 94, 93–99.
- Tort, L., 2011. Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35 (12), 1366–1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
- Trindade, F.T.T., Stabeli, R.G., Pereira, A.A., Facundo, V.A., Silva, A. de A. 2013. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oil-resin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23 (3), 464–470. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000038>
- Valentim, D. S. S., Duarte, J. L., Oliveira, A. E. M. F. M., Cruz, R. A. S., Carvalho, J. C. T., Solans, C., Tavares-Dias, M. 2018. Effects of a nanoemulsion with *Copaifera officinalis* oleoresin against monogenean parasites of *Colossoma macropomum*: A Neotropical Serrasalminae. *Journal of fish diseases*, 41 (7), 1041-1048. <https://doi.org/10.1111/jfd.12793>
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pala, G., Jesus, R.B., Kotzent, S., Costa, J.C., Silva, T.F.A., Pilarski, F. 2017. Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquac. Res.* 1, 1-10. <https://doi.org/10.1111/are.13386>
- Vallejos-Vidal, E., Reyes-Lopez, F., Teles, M., MacKenzie, S., 2016. The response of fish to immunostimulant diets. *Fish Shellfish Immunol.* 56, 34–69.
- Van Hai, N., 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. *Aquaculture* 446, 88–96.
- Veiga-Junior, V.F.; Pinto, A.C. 2002. O gênero *Copaifera* L. *Química Nova* 25 (2), 273-286.
- Veiga-Júnior, V.F., Rosas, E.C., Carvalho, M.V., Henriques, M.G.M.O., Pinto, A.C. 2007. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 248–254.
- Wagner, T., Congleton, J.L. 2004. Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61 (7), 1066-1074.
- Wedemeyer, G.A., Barton, B.A, McLeay, D.J. 1990. Stress and acclimation. In: Schreck C, Moyle P, editors. *Methods in fish biology*. Bethesda (MD): American Fisheries Society, 451–89.
- Wendover, N., Aguirre, M., Zanol, R., Cericato, L., Wardle, R. 2011. *Streptococcus* in tilapia. *Animal Health & Welfare*. 1-8.
- WHO. World Health Organization. 2006. Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. 97pp.

Wu, H., Ohnuki, H., Ota, S., Murata, M., Yoshiura, Y., endo, H. 2017. New approach for monitoring fish stress: A novel enzyme-functionalized label-free immunosensor system for detecting cortisol levels in fish. *Biosensors and Bioelectronics* 93, 57-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.001>

Yarahmadi, P., Farsani, H.G., Khazaei, A., Khodadadi, M., Rashidiyan, G., Jalali, M.A., 2016. Protective effects of the prebiotic on the immunological indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 54, 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.010>

Zhong Y., Chen, Z.F., Dai, X., Liu, S.S., zheng, G., Zhu, X., Liu, S., Yin, Y., Liu, G., Cai, Z. 2018. Investigation of the interaction between the fate of antibiotics in aquafarms and their level in the environment. *Journal of Environmental Management* 207, 219-229. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.030>