

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 02/03/2024.

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 Aqüicultura 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.

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 canabinoide 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*.

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., Fracarolli, 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/jcbrn.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 Monsex 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 Serrasalmidae. *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: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., Zanoló, R., Cericarto, 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>