

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Adição de óleo de *Citrus sinensis* na dieta de
tilápia-do-Nilo: desempenho produtivo, perfil
hematológico e atividade respiratória de
leucócitos.**

Bruno Tadeu Marotta Lima

Jaboticabal, SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Adição de óleo de *Citrus sinensis* na dieta de tilápia-do-Nilo: desempenho produtivo, perfil hematológico e atividade respiratória de leucócitos.

Bruno Tadeu Marotta Lima

Orientador: Dr. João Batista Kochemborger Fernandes

Co-orientadora: Dra. Jaqueline Biller Dalbello Takahashi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal, SP

2015

DEDICATÓRIA

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante minha trajetória, em especial ao Prof. João Batista Kochenborger e à Profa. Jaqueline Dalbello Biller Takahashi, responsáveis pela realização deste trabalho.

Aos meus pais, irmãos, minha noiva Samara e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao Curso de Aquicultura do Caunesp, e às pessoas com quem convivi ao longo desses anos. As experiências de uma produção compartilhada na comunhão com amigos foram as melhores da minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado neste caminho, e por me dar fé e forças para enfrentar os momentos difíceis, para que eu pudesse desenvolver e finalizar este trabalho.

Ao Caunesp, seu corpo docente, ao coordenador Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni, e administração, Veralice Cappatto e David Oliveira Lorente, além de todos os funcionários, que sempre dispuseram de ajuda e apoio e oportunizaram a janela que hoje vislumbro um caminho de vitórias e conquistas.

Agradeço de forma especial à minha noiva Samara, por fazer parte dos melhores momentos da minha vida e sempre estar ao meu lado, acreditando em meus esforços, além de ter me ajudado, apoiado e dividido felicidades e tristezas, sempre me confortando com muito amor e carinho.

Aos meus pais, José e Marta, irmãos, Marcelo e José Rodrigo e familiares, que acreditaram em meus esforços e me apoiaram em meus sonhos e todos os momentos, e em especial minha avó, Maria, minha segunda mãe, por ter feito parte de minha educação, pelo carinho, por sempre me guiar no caminho certo e me fez ter fé para acreditar em meus esforços, e meu avô, Murilo, por ter proporcionado muitas risadas e momentos alegria, além de terem proporcionado momentos de muito afeto, que com muitas saudades me fazem lembrar das minhas melhores lembranças.

Ao Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes, orientador dedicado que com sabedoria soube dirigir-me os passos e os pensamentos para o alcance de meus objetivos.

À Profa. Dra. Jaqueline Dalbello Biller Takahashi, coorientadora que me ajudou com ensinamentos e por prestar a orientação e esclarecimentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Sussumu Takahashi por fazer parte de meus aprendizados e por sempre ter acreditado em meus esforços, além de ter me guiado neste caminho que hoje faz parte dos meus sonhos.

Desejo apresentar meu carinhoso agradecimento à equipe do laboratório: Jefferson Yunis, Daniel Cala, Fernando Gonçalves, Fábio Rodrigues, Alexandre Diogenes, Thiago Fernandes e estagiários, que não mediram esforços para me ajudar e com quem aprendi e convivi cada momento especial dessa minha trajetória.

A todos os técnicos do Caunesp em especial o Valdecir, que não mediram esforços e se dedicaram muito, me ajudando a erguer os pilares deste trabalho.

À todos os colegas e amigos do Caunesp e do FCAV-Unesp, em especial ao laboratório de reprodução, de genética e de patologia do Caunesp, que dividiram ótimos momentos, além de terem dedicado seus esforços para me ajudar.

À Profa Dra. Fabiana Pilarski, que me acolheu com muito carinho e dedicação, me cedeu espaço, muita ajuda e dicas que foram determinantes para a execução das minhas análises.

Ao prof. Dr. Claudinei da Cruz, e a todos os colegas do NEPEAM, pela colaboração e pelo espaço físico cedido.

Aos docentes Prof Dr. Diogo Hashimoto, Dalton Carneiro, Lucia Sipaúba, Marta Verardino que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

Aos membros da minha banca de defesa Prof. Dr. Flávio Moraes e Dr. Fábio Sussel, por disporem de tempo e dedicação nas correções e dicas na minha dissertação.

Ao Orlando Duitama, por ter sido um amigo, “irmão” e companheiro, que por muito tempo dividiu muitos momentos de alegria, sabedoria e amparo.

A empresa Citrosuco Sa Agroindústria, por ter cedido o óleo essencial de laranja para ser utilizado neste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e auxílios na realização deste trabalho.

Lima, Bruno Tadeu Marotta
L732a Adição do óleo de *Citrus sinensis* na dieta de tilápia-do-Nilo :
desempenho produtivo, perfil hematológico e atividade respiratória de
leucócitos / Bruno Tadeu Marotta Lima. -- Jaboticabal, 2015
x, 66 f. : 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aquicultura, 2015

Orientador: João Batista Kochenborger Fernandes

Co-orientadora: Jaqueline Biller Dalbello Takahashi

Banca examinadora: Flávio Ruas de Moraes, Fábio Rosa Sussel

Bibliografia

1. Tilápia. 2. Desempenho. 3. Óleo essencial. 4. Imunoestimulante.
5. Hematologia. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 693.3.043.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: bumarotta@gmail.com

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	- 3 -
AGRADECIMENTOS.....	- 4 -
TABELAS	- 10 -
APOIO FINANCEIRO	- 11 -
RESUMO	- 12 -
ABSTRACT	- 13 -
1. INTRODUÇÃO	- 14 -
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	- 17 -
2.1. ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA – <i>Citrus sinensis</i>	- 17 -
2.1.1. IMPORTÂNCIA DOS FITOTERÁPICOS	- 17 -
2.1.2. O ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA.....	- 19 -
2.1.3. DESEMPENHO PRODUTIVO	- 20 -
2.1.4. EFEITO ANTI-MICROBIANO	- 23 -
2.1.5. MECANISMO DE AÇÃO	- 26 -
2.1.6. SISTEMA IMUNE	- 27 -
3. OBJETIVOS	- 32 -
3.1. OBJETIVO GERAL.....	- 32 -
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	- 32 -
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	- 33 -
4.1. EXPERIMENTO	- 33 -
4.2. ÓLEO ESSENCIAL.....	- 34 -
4.3. DIETAS EXPERIMENTAIS	- 36 -
4.4. DESEMPENHO PRODUTIVO.....	- 36 -
4.5. ESTÍMULO IMUNE	- 38 -

4.5.1. HEMATOLOGIA	- 39 -
4.5.2. ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE LEUCÓCITOS	- 40 -
4.6. BACTÉRIA.....	- 41 -
5. ESTATÍSTICA	- 41 -
6. RESULTADOS.....	- 42 -
6.1. DESEMPENHO PRODUTIVO.....	- 42 -
6.2. HEMATOLOGIA	- 44 -
6.2.1. CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS.....	- 44 -
6.2.2. SÉRIE VERMELHA	- 47 -
6.2.3. ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE LEUCÓCITOS	- 50 -
7. DISCUSSÃO	- 53 -
8. CONCLUSÃO	- 60 -
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	- 61 -
10. BIBLIOGRAFIA	- 62 -

TABELAS

- Tabela 1.** Percentual químico do óleo essencial de *Citrus sinensis*. - 35 -
- Tabela 2.** Formulação e composição da dieta experimental..... - 37 -
- Tabela 3.** Parâmetros de desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo para os dois períodos de coletas (0-45, 45- 90 e 0-90 dias), alimentadas com dietas suplementadas com óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*). - 43 -
- Tabela 4.** Variáveis hematológicas da contagem diferencial de leucócitos em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 45 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*..... - 45 -
- Tabela 5.** Variáveis hematológicas da contagem diferencial de leucócitos em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 90 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*..... - 46 -
- Tabela 6.** Variável hematológica da série vermelha em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 45 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*. - 48 -
- Tabela 7.** Variável hematológico da série vermelha em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 90 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*. - 49 -
- Tabela 8.** Análise da atividade respiratória de leucócitos em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 45 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*..... - 51 -
- Tabela 9.** Análise da atividade respiratória de leucócitos em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 90 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*..... - 52 -

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -
CNPQ, Bolsa de mestrado. Processo: 130582/2013-1

RESUMO

O óleo essencial de laranja (OEC) - *Citrus sinensis* é um subproduto fitoterápico extraído do resíduo da indústria de citros, reconhecido como uma alternativa segura em alimentos, como agente antimicrobiano e no tratamento de enfermidades. O presente estudo foi realizado para determinar os efeitos do óleo essencial de laranja na dieta de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o desempenho produtivo, variáveis hematológicas e na atividade respiratória de leucócitos na resistência contra o *Streptococcus agalactiae*. Os peixes foram submetidos a cinco tratamentos (0, 50, 100, 200 e 400 mg kg⁻¹), que foram os níveis de inclusão do óleo essencial de laranja na ração nos níveis de grupo controle (controle positivo; controle negativo) e o grupo tratado com o óleo essencial de citros, incorporado nas dietas. Foram investigados a atividade respiratória de leucócitos, hematológicas (hematócrito; teor de hemoglobina; contagem de eritrócitos; contagem diferencial de leucócitos) e a avaliação de desempenho produtivo (fator de condição corporal, percentual de ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico, ganho de peso e sobrevivência). Os resultados desse estudo mostraram que a utilização do OEC não demonstrou efeito significativo no desempenho produtivo das tilápias, quando comparado com o controle. No entanto, o OEC promoveu uma melhora significativa nos parâmetros hematológicos e na atividade respiratória de leucócitos das tilápias desafiadas com *S. agalactiae*, quando comparados com o controle, indicando que este fitoterápico pode ser utilizado como agente antimicrobiano sendo alternativa ao uso de antibióticos.

PALAVRAS-CHAVE: Tilápia; Citrus; Óleo essencial; Streptococcus; Desempenho; Imunoestimulante; Hematologia.

ABSTRACT

Orange essential oil (OEC) - *Citrus sinensis*, is a herbal medicine extracted byproduct of the citrus industry residue, recognized as a safe alternative in foods such as antimicrobial agent and in the treatment of diseases. The present study was conducted to determine the effects of orange essential oil in the diet of tilapia (*Oreochromis niloticus*) on growth performance, haematological and immunological parameters in resistance against *Streptococcus agalactiae*. The fish were submitted to five treatments (0, 50, 100, 200 and 400 mg kg⁻¹), which was the inclusion levels in orange essential oil feed levels in the control group (positive control, negative control) and the group treated the orange essential oil, incorporated in the diets. We investigated the respiratory activity of leukocytes, hematological (hematocrit, hemoglobin, red blood cell count, white blood cell differential count) and evaluation of animal performance (condition factor, weight gain percentage, feed conversion, specific growth rate, weight gain and survival). The results of this study showed that the use of OEC showed no significant effect on the performance of tilapia, when compared with the control. However, the OEC promoted a significant improvement in blood parameters and respiratory activity of leukocytes of tilapia challenged with *S. agalactiae*, when compared to the control, indicating that this herbal medicine can be used as an antimicrobial agent as an alternative to antibiotics.

KEY-WORDS: Tilapia; Citrus; Essential Oil; Streptococcus; Performance; Immunostimulant; Hematology.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos principais setores de produção de alimentos de origem animal no mundo e tem crescido de forma constante nos últimos anos, a uma taxa média anual de 6,2%, ultrapassando o crescimento da população mundial em 1,6% e atingindo recorde histórico em 2012 de 90,4 milhões toneladas (peso vivo), (US\$ 144,4 bilhões). O consumo do pescado aumentou significativamente nas últimas cinco décadas, em razão do rápido crescimento populacional, o aumento da renda e a urbanização (FAO, 2014).

Os principais países produtores são responsáveis por 92,7% da produção de peixes em 2012. A rápida expansão ocorrida na América Latina (10%) se deve às novas práticas tecnológicas e a intensificação do processo de produção do pescado. O Chile é o maior produtor de pescado deste continente e o Brasil vem logo atrás e ocupa o segundo lugar no ranking. Nos últimos anos, o Brasil melhorou significativamente sua produção de pescado, com aumento de 16,9% (2003-2012), ocupando o décimo lugar no ranking geral dos maiores produtores de pescado. Aquicultura brasileira é baseada principalmente na criação de espécies de peixes exóticos de água doce, tais como, tilápia, carpa, e truta arco-íris, cuja produção foi de aproximadamente 611 mil toneladas em 2012 (FAO, 2014; MARTINO et al., 2002).

Cerca de 9% da água doce de rios, lagos e águas subterrâneas é disponível para uso humano (FAO, 2014). O Brasil é um dos países maiores países do mundo com 14% da água doce disponível no planeta (TUNDISI; TUNDISI, 2012), 5,6 milhões de hectares de águas represadas em lagos e reservatórios (GROUP, 2014) e um litoral que se estende mais de 8000 km (GROUP, 2014).

A produção nacional de pescado por Unidade da Federação para o ano de 2010 demonstrou que o Estado de São Paulo é um dos principais produtores de pescado com 45.084,4 toneladas e assume o primeiro lugar do ranking da região sudeste do país (MPA, 2014).

Os peixes representam importante fonte de proteínas para nutrição equilibrada e de boa saúde. A produção aquícola aumentou em todo o mundo, principalmente devido a maior demanda por produtos saudáveis, bem como a necessidade de novas fontes de alimento, sendo o setor produtor de alimentos de origem animal o que mais cresce nos últimos anos, com aumento médio anual de 6% ao ano na última década (FAO, 2012; SHARMA et al., 2013).

A tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae; Teleosteo), é um peixe nativo da África criado em 135 países e é a segunda espécie mais utilizada no mundo, principalmente na aquicultura tropical, devido ao seu elevado teor de proteínas, rusticidade, capacidade de tolerar condições ambientais adversos, fácil estratégias reprodutivas, de crescimento rápido, e hábito alimentar agressivo e onívoro (CANONICO et al., 2005; FAO, 2014; MARTIN; VALENTINE; VALENTINE, 2010; NYINGI et al., 2009; TACON; METIAN, 2008). Sua produção mundial atingiu 3,95 milhões de toneladas em 2011 e a perspectiva para 2030 é que a produção da tilápia aumente em 30% (FAO, 2014). Essa espécie é criada em quase todo território brasileiro e sua produção foi de 9.681,6 toneladas em 2011 (MPA, 2014).

A intensificação da aquicultura é uma das principais necessidades para lidar com a demanda de alimentos, portanto, o aumento da taxa de produtividade por unidade de espaço pode interpretado como uma prática ferramenta,

entretanto, esse procedimento tende levar a uma série de fatores estressantes tais como superlotação, transporte, manuseio e má qualidade da água, aumentando a susceptibilidade dos peixes à ação dos agentes infecciosos, abrindo o caminho para o surgimento de doenças, que podem limitar a produção e causar perdas enormes e mortalidade dos animais (LI; LEWIS; GATLIN, 2004; SMITH, V. J.; BROWN; HAUTON, 2003).

Os patógenos representam uma enorme restrição para a criação de peixes, impedindo o desenvolvimento econômico e social (BONDAD-REANTASO et al., 2005). A streptococcicosis tem sido considerada uma das principais doenças em peixes no mundo (AUSTIN, 2012; INGLIS; ROBERTS; BROMAGE, 1993; KUSUDA; SALATI, 1993). *Streptococcus sp.* são bactérias gram-positivas que tem representado grande importância para a aquicultura por causar significativa mortalidade, e é a principal causa de estreptococose em tilápia (EVANS et al., 2002; KITAO; AOKI; SAKOH, 1981; TUNG; CHEN; TSAI, 1985). A infecção provocada por essa bactéria induz a vários sinais clínicos, que incluem hemorragias, perda de apetite, opacidade da córnea e o deslocamento da coluna (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011).

O uso descontrolado de antibióticos como agente de controle biológico é uma prática potencialmente prejudicial para a saúde e para o meio ambiente, e leva o desenvolvimento de cepas resistentes (BOXALL et al., 2004; CAPONE et al., 1996; GOLDBURG; NAYLOR, 2005; GRÄSLUND; BENGTSSON, 2001; HAYA; BURRIDGE; CHANG, 2001; NAYLOR; BURKE, 2005). Diversos trabalhos relataram que o uso descontrolado de antibióticos tem sido acompanhado por um aumento da resistência de patógenos de peixes, prejudicando sua eficácia em tratamentos (RHODES, G. et al., 2000; RHODES, L. D. et al., 2000; SCHMIDT et

al., 2001). Devido aos riscos oferecidos pelos antibióticos, muitos países recusaram-se a consumir alimentos contaminados com estas substâncias, intensificando pesquisas complementares por recursos terapêuticos alternativos (LEE, J. Y.; GAO, 2012).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA – *Citrus sinensis*

2.1.1. IMPORTÂNCIA DOS FITOTERÁPICOS

A produção de aditivos para espécies aquáticas é um setor de crescimento. Com a constante pressão sobre a indústria para reduzir o uso de antibióticos e encontrar alternativas seguras e eficientes, foram necessários o desenvolvimento de estratégias de suplementação como alternativa ao uso de antibióticos nas dietas de peixes. Nos últimos anos, houve um aumento significativo da utilização de imunostimulantes fitoterápicos, melhorando a saúde e sobrevivência dos animais (BARROS et al., 2014; DUNCAN; KLESIOUS, 1996; FRANCIS; MAKKAR; BECKER, 2001)

A fitoterapia representa uma síntese de diversas linhas botânicas, da medicina baseada em evidências tradicionais e antepassadas, diferentemente da prática médica habitual, utilizando as fórmulas químicas complexas elaboradas por plantas ao longo de milênios em relação com o resto dos seres do planeta, que combinadas racionalmente podem possibilitar melhoras evidentes, portanto,

esses componentes químicos têm atividade farmacológica e é aproveitada pela indústria farmacêutica para desenvolver novos fármacos (CONWAY; DIP PHYT; MCP, 2011; WYNN; FOUGERE, 2006).

A crescente preocupação com a transmissão e a proliferação de bactérias resistentes através da cadeia alimentar tem levado à proibição da utilização de antibióticos promotores de crescimento (AGP). Portanto, notoriamente houve demandas por recursos controladores de agentes patógenos, exigindo intensas pesquisas sobre o uso de imunostimulantes para peixes, de forma a atender o mercado da indústria da aquicultura (GRAVE et al., 2006). Os imunostimulantes podem favorecer a saúde dos peixes e prevenir mortalidades. O tratamento com imunostimulantes mostrou aumento na resistência contra parasitas e infecções bacterianas de importância aquícola, como *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *A. salmonicida*, e *Streptococcus sp.* (SAKAI, MASAHIRO, 1999).

Desde a proibição na União Europeia por antibióticos promotores de crescimento, o interesse por alimentos considerados seguros ganharam interesse em estratégias de alimentação alternativa para o futuro, especialmente pelos óleos essenciais, ingredientes tradicionais realçador de sabor que podem ser utilizados como um ponto de partida para o uso como nutriente alternativo pela indústria de alimentos (BURDOCK; CARABIN, 2004; FISHER; PHILLIPS, 2008; LÓPEZ-MALO; ALZAMORA; PALOU, 2005). Portanto, a fitoterapia é uma atividade promissora que propicia melhoras no sistema imune em peixes, aumentando a produção de anticorpos, que ajudam a proteger contra agentes patogênicos (ANDERSON, DOUGLAS P, 1992; ONARHEIM, 1992; RAA et al., 1992).

2.1.2. O ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA

O óleo de laranja doce (*Citrus sinensis*) da família Rutáceas, possui cerca de 200 componentes químicos entre voláteis (85 - 99%), e não voláteis (1 – 15%), uma mistura complexa de terpenos, monoterpenos, hidrocarbonetos sesquiterpeno, além de derivados (1.8 - 2.2%), oxigenados e fenólicos, aldeídos (citral), cetonas, ácidos, álcoois (linalol) e ésteres, formada a partir de metabólitos secundários de plantas que consistem baixo ponto de ebulição, obtidas a partir da extração por métodos de destilação, em particular, destilação a vapor de materiais vegetal (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos e raízes)(BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997; BORGMANN et al., 2004; CACCIONI, D.; DEANS; RUBERTO, 1995; DAVIDSON; NAIDU, 2000; FLAMINI; TEBANO; CIONI, 2007; GREATHEAD, 2003; MOUFIDA; MARZOUK, 2003; SMITH, D. C. et al., 2001; SVOBODA; GREENAWAY, 2003; WOLFORD; KESTERSON; ATTAWAY, 1971). De acordo com os resultados de diferentes autores, os óleos essenciais de laranja, limão e tangerina mostraram que o limoneno foi o componente presente em maior percentagem - 32 – 99% (CACCIONI, D. R. et al., 1998; CHUTIA et al., 2009; ESPINA et al., 2011; FISHER; PHILLIPS, 2006; LOTA et al., 2001; MOUFIDA; MARZOUK, 2003; SVOBODA; GREENAWAY, 2003).

Os óleos essenciais são compostos bioativos, utilizados desde a antiguidade como antídotos para venenos ou náuseas e dor de estômago como resultado de possível intoxicação alimentar. Atualmente como produtos farmacêuticos na medicina alternativa como terapia natural, fornecendo agentes antioxidantes e antimicrobianos naturais para diversas bactérias e fungos que favorecem os requisitos das indústrias alimentares, como promotores de

crescimento, redução do colesterol e de ácido úrico, além de muitas outras atividades que promovem a versátil utilização do óleo essencial de citros (ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006; ARIAS; RAMÓN-LACA, 2005; BRENES; ROURA, 2010; DORMAN; DEANS, 2000; FISHER; PHILLIPS, 2008; MOREIRA et al., 2005; STAMMATI et al., 1999).

2.1.3. DESEMPENHO PRODUTIVO

Os diversos potenciais dos imunoestimulantes tais como glucanos (BOONYARATPALIN et al., 1995); gossipol e saponina (ACAMOVIC; BROOKER, 2005), gengibre (INCHAROEN; YAMAUCHI; THONGWITTAYA, 2010), o tanino (FRANCIS et al., 2001) e levamisol (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006) tem despertado grande interesse pelos pesquisadores, principalmente pelo fato desses produtos promoverem melhora no desempenho produtivo.

Os óleos essenciais são fitoterápicos que podem ser utilizados nas dietas como meio para melhorar a sobrevivência (ZHENG et al., 2009), desempenho produtivo (BRENES; ROURA, 2010; ZHENG et al., 2009), microbiota intestinal (MAHMOUD et al., 2004; NAVARRETE et al., 2010). Em estudos recentes foram obtidas diferenças significativas no desempenho produtivo e na sobrevivência de peixes alimentados com dietas contendo óleo essencial de laranja (ACAR et al., 2015).

O óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é tradicionalmente utilizado em alimentos (PRASAD et al., 1986), a sua utilização em dietas de para tilápias melhorou a taxa de crescimento, o índice de palatabilidade e resultou em

uma redução no percentual de resíduos da dieta (33,48%), diminuindo o custo da alimentação (EL-DAKAR et al.).

O alho (*Allium sativum*) é um bulboso utilizado na culinária e na medicina alternativa desde antiguidade como anti-microbiano e no tratamento de inflamações (HARRIS et al., 2001). A utilização de óleo de alho demonstrou melhoras no ganho de peso, peso final e no desempenho produtivo em tilápia-do-Nilo, com taxa de mortalidade mais baixa do que o grupo controle (METWALLY, 2009). Dietas enriquecidas com alho promoveram aumento no ganho de peso, fator de condição e reduziu a mortalidade em tilápia-do-Nilo desafiadas com *Pseudomonas fluorescens*, possibilitando superar o estresse devido ao frio durante o período do inverno (DIAB et al., 2008).

Um dos principais componentes dos óleos essenciais de citros é o d-limoneno, um terpeno que também apresentou melhora no desempenho produtivo em ratos (ESWARAN et al., 2010; ZHU; LEW; LEUNG, 2002). Esse terpeno mostrou ser capaz de diminuir a concentração de colesterol no soro de frangos (QURESHI et al., 1988). Segundo (YILMAZ; ERGÜN; SOYTAŞ, 2013), o d-limoneno é um dos principais componentes do cominho (*Cuminum cyminum*), utilizado como aditivo alimentar sobre o desempenho produtivo em tilápia-do-Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) demonstrou melhoras no peso final, ganho de peso, peso médio e no comprimento médio.

Segundo (ALÇIÇEK; BOZKURT; ÇABUK, 2004), a utilização de mix de óleos essenciais contendo óleo da casca de frutas cítricas (*Citrus sp.*) em dietas para frangos demonstrou melhoras o desempenho produtivo (ganho de peso, consumo alimentar, conversão alimentar). A polpa cítrica é um subproduto da

indústria da laranja caracterizada por seu elevado valor energético e de terpenos (AMMERMAN; HENRY, 1991). A utilização de polpa de *C. sinensis* em dietas para coelhos mostrou ter efeito significativo no ganho de peso, no consumo e no peso final (HON; OLUREMI; ANUGWA, 2009), e em frangos demonstrou melhoras no consumo de ração, ganho de peso e na conversão alimentar (EBRAHIMI et al., 2013).

O processo de fermentação de subprodutos de citros apresentam melhor digestibilidade dos nutrientes e pode melhorar seu valor nutricional, incluindo aumento dos níveis de proteína bruta, extrato etéreo e carboidratos estruturais em comparação com um grupo não tratado (AREGHEORE, 2000; SCERRA et al., 1999). A suplementação de dietas contendo citros fermentados demonstrou aumentar a sobrevivência em linguado (*Paralichthys olivaceus*) desafiado com *Edwardsiella tarda* e *Bacillus subtilis* (LEE, B. J. et al., 2013).

As várias espécies de citros contêm grandes quantidades de óleos essenciais, que são utilizados em muitos campos, e possui propriedades biológicas que podem melhorar o desempenho produtivo. O óleo essencial de laranja é uma alternativa segura e natural como promotor de crescimento e possui propriedades capazes de melhorar o desempenho produtivo em tilápias-do-Moçambique, aumentando o ganho de peso, conversão alimentar e a taxa de crescimento específico (ACAR et al., 2015; VAN HUNG; CHI; PHI, 2013). O desempenho produtivo é um dos principais fatores que impactam o custo da produção de peixes, portanto, a melhoria desse parâmetro pode ser uma alternativa na redução de custos (LOSORDO; WESTERMAN, 1994).

2.1.4. EFEITO ANTI-MICROBIANO

A prevenção de doenças é essencial para o desenvolvimento contínuo da aquicultura em todo o mundo, portanto, os fitoterápicos oferecem métodos promissores para o controle de enfermidades na piscicultura, protegendo os peixes e controlando doenças, pela indução de mecanismos de defesa não específico, elevando a resposta imune e o número de células formadoras de placas de anticorpos (ANDERSON, DOUGLAS P, 1992; PLANT; LAPATRA, 2011; SAKAI, MASAHIRO, 1999). Estudos demonstram que os óleos essenciais apresentaram atividades antimicrobianas in-vitro, inclusive, melhoras no controle microbiano, da ativação dos linfócitos, das atividades induzidas por mitogênio concanavalina A ou dos lipopolissacáridos, que ativam os macrófagos, e na atividade de lisozima e catalase plasmática de peixes alimentados com a dieta contendo óleo essencial (AWAD; AUSTIN; LYNDON, 2013; BILEN; BULUT; BILEN, 2011; BLUMA et al., 2008; BURT, 2004; DORMAN; DEANS, 2000; DUŠAN et al., 2006; INOUE; TAKIZAWA; YAMAGUCHI, 2001; LANCIOTTI et al., 2004; MOUREY; CANILLAC, 2002; NYCHAS, 1995; SIWICKI, A. et al., 1996; SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998; TASSOU; NYCHAS, 1995; ZHENG et al., 2009).

Os óleos essenciais de citros são utilizados há muitos anos como essência aromática, na cura de problemas gastrointestinal e no combate de agentes microbianos (BURT, 2004; MORAES et al., 2009). Devido novas tendências de consumo, mudanças na legislação contra o uso de promotores de crescimento e o aumento de patógenos resistentes, os óleo essenciais de citros são uma alternativa natural e segura ao uso de antibióticos em alimentos (FISHER; PHILLIPS, 2008).

Para avaliar o efeito antimicrobiano do óleo essencial são conduzidos testes preliminares realizado in-vitro pelo método de difusão em filtro de disco impregnado com o agente antimicrobiano, colocando na superfície do agar inoculado com o microorganismo em placa de petri e é observado a inibição do crescimento, ou seja, a formação de halos pelos microorganismo, indicando se houve a presença e ou ausência do efeito do agente anti-microbiano (BAUER et al., 1966; DEANS; RITCHIE, 1987; FISHER; PHILLIPS, 2006; SKANDAMIS; NYCHAS, 2001; SMITH-PALMER et al., 1998; WANNISSORN et al., 2005). Testes in vitro com o óleo essencial de *C. sinensis* em concentrações de 2000 ppm demonstraram total inibição dos esporos de *Bacillus subtilis* e de *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus plantarum* (SUBBA; SOUMITHRI; RAO, 1967). Além disso, o óleo de citrus incrementa atividade antimicrobiana para bactérias Gram-negativas (*Salmonella spp*; *Escherichia coli* O157:H7) e, principalmente, para bactérias Gram-positivas como *Streptococcus agalactiae*, que causam grandes prejuízos na criação de tilápias (ACAR et al., 2015; CACCIONI, D. et al., 1995; CHAO; YOUNG; OBERG, 2000; ESPINA et al., 2011; FISHER; PHILLIPS, 2008; FISHER; PHILLIPS, 2006; OLASUPO et al., 2003; TSAI, 2008; WU et al., 2013).

Um dos principais componentes dos óleos essenciais de citrus é o d-limoneno, um terpeno que pode ser utilizado em altas concentrações, apresenta baixa toxicidade e é considerado um alimento seguro listado no Código de Regulamentos Federal, que regula seu uso em alimentos (SUN, 2007). As atividades antimicrobiana desse monoterpeneo permite inibir o crescimento de *Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus sp*, modificando a membrana celular, tornando-os mais permeável, e particionando os lipídios da membrana celular da

bactéria (DEANS; RITCHIE, 1987; DORMAN; DEANS, 2000; MIRGHAED; YADOLLAHI, 2013; SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994). O linalol e o citral são outros componentes encontrados nos óleos de citrus capazes de apresentar efeitos antimicrobianos contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Streptococcus aureus*, em concentrações aceitáveis para aplicação em alimentos (FISHER; PHILLIPS, 2006). Portanto, o óleo essencial de laranja pode ser utilizado em alimentos como uma possível alternativa natural e de baixo custo ao uso de antibióticos para o controle de bactérias (LANCIOTTI et al., 2004; LEWIS; AUSUBEL, 2006).

O eugenol é um antisséptico aromático e o principal componente do óleo essencial de cravo, utilizado em tratamentos odontológicos e em doenças orais (DIDRY; DUBREUIL; PINKAS, 1994). Esse terpeno foi testado in vitro e em camundongos e demonstrou possuir atividades anti-virais contra o vírus do herpes humano (HSV-1). O tratamento com o eugenol inibiu a ação do HSV-1 testado in vitro e retardou significativamente o desenvolvimento nos camundongos infectados, indicando assim que este composto pode ser útil no tratamento de infecções herpéticas, podendo ser utilizado em tratamentos tópicos (BENENCIA; COURREGES, 2000).

Segundo (RAPHAEL; KUTTAN*, 2003), estudos com ratos foi possível constatar atividade imunomoduladora na administração de d-limoneno (100 µmol/Kg de peso corporal / dose / animal) através do aumento da produção total de anticorpos e das células produtoras de anticorpos. A administração oral de óleo essencial de *Citrus auraptene* em ratos mostrou efetivamente aumento na função de macrófagos e de linfócitos em ratos (TANAKA et al., 1999). Os macrófagos são

conhecidos por desempenhar um papel importante nos mecanismos de defesa para proteger o hospedeiro contra os agentes microbianos (BELARDELLI, 1995).

A utilização do óleo essencial de *C. sinensis* mostrou melhora nos parâmetros imunes, como lisozima e atividade da mieloperoxidase e hematológicos em tilápia-do-Moçambique. A lisozima é uma enzima que hidrolisa e danifica as paredes celulares bacterianas e apresenta papel importante no mecanismo de defesa em peixes, combatendo doenças e infecções (MASSCHALCK; MICHIELS, 2003; SAURABH; SAHOO, 2008). A mieloperoxidase é a enzima mais abundante em neutrófilos e sua versatilidade catalítica lhe confere habilidade de reagir com uma série de substratos, é liberada em resposta a invasão microbiana, utilizada como marcador de inflamações (KLEBANOFF, 1991). Portanto a inibição de mieloperoxidase pode resultar num efeito anti-inflamatório (NIEMEGEREERS; VERBRUGGEN; JANSSEN, 1964).

2.1.5. MECANISMO DE AÇÃO

Os óleos essenciais têm efeito bacteriostático e antimicrobiano contra diversas bactérias que, expostas a uma concentração mínima inibitória, podendo ser controladas ou até mesmo erradicadas (ACAR et al., 2015; FISHER; PHILLIPS, 2009; MULYANINGSIH et al., 2010; OPALCHENOVA; OBRESHKOVA, 2003).

A exposição de bactérias, tanto Gram-positivos quanto Gram-negativa, aos óleos essenciais, pode demonstrar efeitos significativos na inibição do microrganismo como: desagregando e penetrando a estrutura de lipídios da parede celular da bactéria, o que leva a uma desnaturação das proteínas e à

destruição da membrana celular, conduzindo a perdas citoplasmática e lise celular; fluidez e desintegração da membrana exterior, resultando num colapso do potencial de membrana e a inibição da síntese de ATP; espessando e rompendo a parede celular, em conjunto com o aumento da rugosidade e falta de citoplasma; penetração da membrana mitocondrial conduzindo a uma maior permeabilidade da organela e perda dos íons (FISHER; PHILLIPS, 2009; HELANDER et al., 1998; OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2006; RASOOLI; REZAEI; ALLAMEH, 2006)

Segundo (FISHER; PHILLIPS, 2008), os mecanismos pelos quais uma mistura de óleos essenciais de citros (*Citrus sinensis* : *Citrus bergamia* – na proporção de 1: 1), provocam efeito antimicrobiano in-vitro contra *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. Através do vapor do óleo de citros foi verificado aumento da permeabilidade celular de 32-40 vezes, provocando a diminuição do pH intracelular e a perda do potencial de condução da membrana, levando a perda de ATP intracelular das bactérias e dos níveis de proteína, além de alterações morfológicas nas células, incluindo perda de distinção da membrana e lise celular, causando morte dos microrganismos.

2.1.6. SISTEMA IMUNE

O sistema imune é formado por células, tecidos e componentes solúveis que reconhecem, atacam e destroem agentes indesejados que possam colocar em perigo a saúde do indivíduo, por meio de dois mecanismos funcionais: a resposta inata e a resposta adaptativa (MAK; SAUNDERS, 2005). A resposta imune adaptativa é conhecida como uma reação imune específica, assim como a

produção de imunoglobulinas específicas, conhecida como anticorpos específicos, que são elementos cruciais na resistência adquirida, e ocorrem durante todo o tempo de vida do hospedeiro, adaptando-se conseqüentemente as infecções provocadas por agentes patogênico ocorrendo apenas quando os mecanismos inatos sinalizarem que existe uma infecção relativamente grave, ao passo que a imunidade inata é responsável por todos os níveis de resposta imune (JANEWAY et al., 2001; PILLAY; KUTTY, 2005).

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão de patógenos ou para lidar com qualquer material estranho (antígeno) (LANGEVIN et al., 2013; SINYAKOV et al., 2002). A resposta imune inata é descrita como uma resposta indiferenciada imediata contra o agente invasor (FEARON, 1997; FEARON; LOCKSLEY, 1996). Este mecanismo de defesa utiliza receptores codificados das células germinativas para reconhecer os agentes patógenos, através de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP's) (JANEWAY JR; MEDZHITOV, 2002).

Os PAMP's são identificados especificamente por um conjunto de receptores que são referidos como receptores de reconhecimento padrão (PRRs), prevenindo o hospedeiro de mutações ou escape microbianos, através de um número limitado de receptores codificados em linha germinal para reconhecer uma grande variedade de estruturas moleculares associados aos agentes patogênicos ou quando as células danificadas, lesadas ou em stress enviam sinais de alarme, muitos dos quais são identificados pelos mesmos receptores que identificam os patógenos (MATZINGER, 2002; MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

A resposta imune inata dos peixes é semelhante às dos vertebrados terrestres, incluindo os processos de fagocitose e a elaboração de anticorpos específicos imunoglobulinas (PILLAY; KUTTY, 2005). Quando um antígeno entra em contato com o hospedeiro, tanto a imunidade humoral quanto as células mediadoras do sistema imune podem ser estimuladas (PARISH, 1972). O parâmetro celular compreende os leucócitos, formados pelas células brancas de defesa e sistema fagocitário, neutrófilos e macrófagos, além de granulócitos, monócitos, células natural killer (NK) e linfócitos T e B. Os componentes humorais compreendem os inibidores de crescimento, enzimas líticas e componentes do sistema complemento, atividade lisozima, hemolisinas naturais, transferrinas, proteína C reativa, aglutininas e precipitina, anticorpos naturais, citocinas, quimiocinas (interferona, interleucina-II) e peptídeos antibacterianos (MAGNADÓTTIR, 2006; SECOMBES; HARDIE; DANIELS, 1996).

As respostas imunes mediadas por células são executadas pelos leucócitos como granulócitos, macrófagos (monócitos), células dendríticas e os linfócitos. Os linfócitos são células agranulocitos funcionais, produzidos pelos órgãos linfóides primários e secundários, componente celular do sistema imune inato, formados por três tipos: natural killer (células de lise), linfócitos T e linfócitos B. Os linfócitos T e B são os leucócitos efetores, que adquirem os seus receptores específicos de antígenos (imunoglobulina para células B e receptor de células-T para as células T) no rim anterior e timo. As células B são responsáveis pela imunidade humoral, portanto, produzem os anticorpos, que funcionam como diferentes classes de imunoglobulinas, para neutralizar o agente patogênico. Os linfócitos T possuem respostas produzidas pelas células T auxiliares, que produzem citocinas, para direcionar a resposta, enquanto que os subconjuntos de

células T citotóxicas, que produzem com enzimas antimicrobianas. Essas respostas são reconhecidas e gravadas na memória células, para montar uma resposta mais forte e rápida ao entrar em contato com o mesmo patógeno (FISCHER; KOPPANG; NAKANISHI, 2013; FLETCHER; SECOMBES, 2010; JANEWAY et al., 2001).

A fagocitose desempenha grande importância para o sistema imune, processo pelo qual os fagócitos (linfócitos e trombócitos) englobam partículas sólidas para formar uma vesícula interno conhecido como um fagossoma, tais como bactérias, e é, por conseguinte, são englobadas por um invólucro de membrana plasmática e são submetidos ataques enzimáticos e de peróxidos tóxicos. Os imunostimulantes tem a capacidade de melhorar as atividades fagocitárias e, por subsequente, a produção de radicais oxidativos que, ao entrar em contato com o agente patogênico, são rapidamente preparados, protegendo o animal (SAKAI, MASAHIRO, 1999). Os mecanismos executados pelos macrófagos podem ser classificados como independente de oxigênio, onde depende da libertação de grânulos, contendo enzimas proteolíticas, tais como as defensinas, lisozima, e proteínas catiônicas, ou dependentes de oxigênio, que utiliza processo de medida de espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas durante Burst oxidativo (KARNOVSKY, M., 1962; KARNOVSKY, M. L., 1962; SAKAI, MASAHIRO, 1999; SAKAI, M; ATSUTA; KOBAYASHI, 1995).

O processo conhecido como oxidativo ou explosão respiratória, desempenha papel importante na fagocitose. É essencial uma reação que ocorre em fagócitos para matar partículas internalizadas e bactérias. Durante a fagocitose, os leucócitos fagocíticos, através de receptores que da superfície do fagócito, os agentes patogênicos são detectados e através das oxidase NADPH

produzem rapidamente a redução de oxigênio, formando radicais livres de superóxido (O_2^-) que exerce atividade tóxica para os microrganismos. As enzimas superóxido dismutase (SOD) dismutam o superóxido em oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um forte agente oxidante, que pode inativar as enzimas metabólicas dos microrganismos, iniciar a peroxidação lipídica microbiana, além de poder reagir novamente com o superóxido e produzir radicais de hidroxila, que ajuda a inibir os agentes patogênicos. A enzima mieloperoxidase, abundante nos neutrófilos, utiliza o peróxido de hidrogênio para oxidar o íon cloreto em hipoclorito (HOCl), que atua, em conjunto com todas essas reações acima, atenuando ou até mesmo matando o agente patogênico (BADWEY; KARNOVSKY, 1980; CAPELLÈRE-BLANDIN, 1998; CURNUTTE; BABIOR; KARNOVSKY, 1979; DAHLGREN; KARLSSON, 1999; FRIDOVICH, 1975; GRAHAM et al., 1967; INOBUCHI et al., 2003; MALE; BROSTOFF, 2007; ROMEO; ZABUCCHI; ROSSI, 1973; SBARRA; KARNOVSKY, 1959).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de óleo de laranja (*Citrus sinensis*) em dietas para tilápia-do-Nilo avaliando-se o desempenho produtivo, variáveis hematológicas e a atividade respiratória de leucócitos dos peixes.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o efeito do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) na dieta de tilápia-do-Nilo sobre as variáveis hematológicas (hematócrito; teor de hemoglobina; contagem de eritrócitos; contagem de leucócitos totais; contagem diferencial de leucócitos) desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.
- Avaliar o efeito do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) na dieta de tilápia-do-Nilo sobre o desempenho produtivo (fator de condição corporal, percentual de ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico, ganho de peso e sobrevivência).
- Avaliar o efeito do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) na dieta de tilápia-do-Nilo desafiadas com *S.agalactiae* sobre a atividade respiratória de leucócitos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no Centro de Aquicultura, UNESP (CAUNESP - Jaboticabal, SP) pelo período de 90 dias, durante os meses de dezembro a fevereiro de 2014.

Foram utilizados 600 juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*, distribuídos em delineamento de blocos casualizados ($65,32 \pm 0,28$ g; $75,68 \pm 0,30$ g; $85,30 \pm 0,32$ g; $96,24 \pm 0,37$ g), obtidos junto ao Setor de Tilapicultura do Centro de Aquicultura, do Caunesp. Os animais foram aclimatados durante 15 dias às condições experimentais e das dietas, sendo alimentados com dieta padrão, sem o óleo essencial, até a saciedade aparente duas vezes por dia às 10:00 e 16:00 horas. Os peixes foram distribuídos em 20 tanques circulares de 2000 L em sistema aberto com abastecimento contínuo de água.

As variáveis de água foram verificadas semanalmente (temperatura da água: 28 ± 2 ° C, o oxigênio dissolvido: $5,0 \pm 0,20$ mg / l e pH: $7,0 \pm 0,5$). Durante o experimento, os peixes foram monitorados e exibiram comportamento normal e sem sinais clínicos indicativos de enfermidades.

4.2. ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *Citrus sinensis* utilizado nesse estudo foi obtido junto à empresa Citrosuco S/A – Agroindustria – Matão – SP, amostra de referencia número 217726. Amostras do óleo essencial de *C. sinensis* foram analisadas por cromatografia de gás (Hewlett Packard 5890), equipado com módulo de injeção de razão de divisão split/splitless e com detector de ionização de chama FID (flame ionization detector), com temperatura programada a 250 °C e fluxo de gás make-up (Nitrogênio). Através de coluna capilar Agilent modelo HP-5 (Crosslinked 5% PH ME siloxane), de 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25mm de espessura de fase estacionária (mícron, film thickness), injetada 1 µL do óleo, com injetor na razão de 1:150, a 250 °C, com pressão constante de 50 kPa, e detectado em FID a 250 °C. A concentração de cada componente foi identificada por comparações de valores programados pelo equipamento de detecção e calculada em % de área (**Tabela 1**).

Tabela 1. Percentual químico do óleo essencial de *Citrus sinensis*.

No.	Compostos	%	No.	Compostos	%
1	Etanol	0,001	23	Nerol	0,008
2	Hexanal	0,002	24	Neral	0,067
3	Butirato de etila	0,001	25	l-Carvona	0,007
4	α -Pinoeno	0,545	26	Geranial	0,113
5	Sabineno / β -Pinoeno	0,286	27	Perillaldehide	0,033
6	Mirceno	1,915	28	Perillalcohol	0,015
7	Octanal	0,459	29	Acetato de Perilla	0,014
8	D-3-Carene	0,167	30	Acetato de Geranilo	0,004
9	d-Limoneno	95,21	31	α -Cubebene	0,021
10	Octanol	0,014	32	Acetato nerilo	0,003
11	Terpinoleno	0,021	33	β -Cubebene	0,021
12	Linalol	0,386	34	Dodecanal	0,04
13	Nonanal	0,081	35	Dimetil Antranilate	0,004
14	Et-OH 3-hexanoato	0,003	36	Cariofileno	0,007
15	Trans-p-Menta-2-8-dien-1-ol	0,004	37	Bergamoteno	0,021
16	Óxido de limoneno	0,009	38	α -Humuleno	0,004
17	Citronelal	0,043	39	Aromadendreno	0,017
18	Terpinen-4-ol	0,001	40	Valenceno	0,016
19	α -Terpineol	0,049	41	d-Cadineno	0,025
20	Decano	0,251	42	β -Sinensal	0,016
21	Acetato octil	0,015	43	α -Sinensal	0,015
22	cis-Carveol	0,009	44	Nootkatone	0,002
					%
Álcoois					0,487
Aldeídos					1,121
Ésteres					0,044
Cetonas					0,018
Hidrocarbonetos					98,33
TOTAL					100

4.3. DIETAS EXPERIMENTAIS

As dietas foram formuladas de acordo com (FURUYA et al., 2004) apresentadas na **tabela 2**, preparadas no Laboratório de Peixes Ornamentais do CAUNESP. Os peixes foram submetidos a cinco tratamentos (0, 50, 100, 200 e 400 mg kg⁻¹), que foram os níveis de inclusão do óleo essencial de laranja na ração nos níveis de grupo controle (controle positivo; controle negativo) e o grupo tratado com o óleo essencial de citros, incorporado nas dietas por aspersão. O óleo essencial de laranja foi diluído em álcool pulverizado sobre a dieta padrão. As dietas foram secas em temperatura ambiente durante 24 h, embaladas e armazenadas em congelador a -20 ° C até serem utilizadas.

4.4. DESEMPENHO PRODUTIVO

Aos 45 e 90 dias após o início do experimento, os peixes foram submetidos ao jejum de 24h para realização de biometrias. Foi avaliado fator de condição corporal (K), percentual de ganho de peso (PGP), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), ganho de peso (GP) e sobrevivência (S), calculados:

Tabela 2. Formulação e composição da dieta experimental

Ingredientes	(g kg ⁻¹)
Milho	30,00
Farelo de soja 48%	20,00
Farelo de arroz	14,77
Farelo de Trigo	13,00
Glúten de milho 60%	12,00
Farinha de vísceras aves	5,00
Farinha de peixe 55%	3,00
DL-Metionina	0,70
Fosfato bicálcico	0,61
L-Triptofano	0,20
L-Lisina	0,16
Antifúngico	0,03
BHT	0,03
Premix ¹	0,50
TOTAL	100
Composição proximal	
Matéria seca (%)	90,10
Proteína bruta (%)	30,00
Energia digestível (kcal.kg ⁻¹)	2990
Extrato etéreo (%)	5,00
Fibra bruta (%)	4,67
Material mineral (%)	4,78
Cálcio (%)	0,66
Lisina (%)	1,60
Metionina (%)	1,12
Triptofano (%)	0,42

¹ Composição do suplemento vitamínico-mineral peixe (Fri-Ribe): vitamina A, 600 000 UI; vitamina D3, 600 000 UI; vitamina E, 12 000 UI; vitamina K3, 1200 mg; vitamina B1, 1200 mg; vitamina B2, 1536 mg; vitamina B6, 1287 mg; vitamina B12, 4000 mg; folato, 198 mg; pantotenato de cálcio, 3800 mg; vitamina C, 48 000 mg; biotina, 20 mg; colina, 30 000 mg; niacina, 19 800 mg; ferro, 25 714 mg; cobre (Cu) 1960 mg; Manganês, 13 334 mg; zinco, 6000 mg; iodo, 948 mg; cobalto, 2 mg; selênio, 30,10 mg.

$$K(\%) = 100 \times \frac{Peso}{comprimento^3}$$

$$PGP(\%) = 100 \times \frac{(Pf - Pi)}{Pi}$$

$$CA(\%) = \frac{GP}{consumo}$$

$$TCE(\%) = 100 \times \frac{(\ln Pf - \ln Pi)}{T}$$

$$GP(g) = Pf - Pi$$

$$S = \frac{\text{número final de peixes}}{\text{número inicial de peixes}} \times 100$$

Onde Pf e Pi são o peso final e inicial, respectivamente, T é a duração do experimento em dias e \ln = logaritmo natural.

4.5. ESTÍMULO IMUNE

Decorridos 45 dias e depois aos 90 dias de experimento, foram submetidos ao desafio utilizando-se *Streptococcus agalactiae* inativada. Para o desafio os peixes submetidos aos tratamentos experimentais foram inoculados por indução a aerocistite e avaliados. Seguindo a metodologia utilizada por (DA SILVA CLAUDIANO et al., 2013), a inoculação na bexiga natatória. A inoculação nos peixes foi divididos em grupo controle negativo (inoculado 0,5 ml de solução de NaCl esterilizada a 0,65% + dieta 0 mg kg⁻¹), grupo controle positivo (inoculado 0,5

ml da diluição estimulatória de *S. agalactiae* + dieta tratamento 0 mg kg⁻¹) e grupo tratamento (inoculado 0,5 ml da diluição estimulatória de *S. agalactiae* + dieta tratamento 50, 100, 200 e 400 mg kg⁻¹). Os peixes foram avaliados em um tempo pré-determinado de 6, 24 e 48 horas. Para cada análise, dois peixes de cada repetição foram coletados ao acaso para avaliar os parâmetros hematológico e imune.

4.5.1. HEMATOLOGIA

Após infecção o sangue foi coletado para ensaios hematológicos e determinação da atividade respiratória de leucócitos. Os peixes foram anestesiados em banho de benzocaína (1g/10L), diluído em álcool. O sangue coletado por punção venosa foi transferido para microtubos heparinizados para as variáveis hematológicas: contagem diferencial de leucócitos e série vermelha (hematócrito, teor de hemoglobina (método com cianometahemoglobina), eritrócitos) (AZIZOĞLU; CENGİZLER, 1996; BLAXHALL; DAISLEY, 1973; COLLIER, 1944; DACIE; LEWIS, 1991; GOLDENFARB et al., 1971). O sangue foi diluído a 1:200 em formol-citrato, para posterior contagem do número de leucócitos e eritrócitos em microscópio. Com esses dados, foram calculados os índices hematimétricos compreendidos como o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). As extensões sanguíneas foram confeccionadas, coradas e analisadas em microscópio óptico comum.

$$VCM(fL) = \frac{\text{hematócrito}}{\text{eritrócito}(10^6\mu L^{-1})} \times 10$$

$$HCM(pg) = \frac{\text{hemoglobina}}{\text{eritrócito}(10^6\mu L^{-1})} \times 10$$

$$CHCM(g dL^{-1}) = \frac{\text{hemoglobina}}{\text{hematócrito}} \times 10$$

4.5.2. ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE LEUCÓCITOS

Para realização do ensaio da atividade respiratória de leucócitos foi alíquotado sangue heparinizado seguindo o protocolo de (ANDERSON, D.P.; SIWICKI, 1995), modificado por (BILLER, 2008). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico, baseado na redução do corante “nitro blue tetrazolium” (NBT) formando precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (KLEIN, 1991). A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm.

4.6. BACTÉRIA

Cepas de *Streptococcus agalactiae* foram isoladas de *Oreochromis niloticus* e identificadas através de sequenciamento do gene 16 S rDNA, estocadas em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, Himedia) com 30% de glicerol 100%, estéril, em freezer -20°C. Uma alíquota de 20ul da cepa estoque foi inoculada em 5 ml de meio BHI, após esse procedimento foi autoclavada e, incubada em estufa bacteriológica a 30°C por 48h para formação do pré-inóculo. Em seguida, adicionou-se um volume total do pré-inóculo em 600 ml de meio BHI autoclavado que foi incubado novamente a 30°C, por mais 48h. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 1000 rpm, por 10min, descartando-se o sobrenadante (meio de cultura) e, desta forma, obtendo-se as cepas da bactéria. Para lavagem das cepas, adicionou-se a uma solução de PBS (0,1M) e, após homogeneizada, realizaram-se três lavagens após centrifugações por 10 min, a 1000 rpm. Foi realizada a diluição da bactéria em concentração de 10^6 (determinada anteriormente pelo teste de CL50), de acordo com a Escala de MacFarland.

5. ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%) através do programa estatístico SAS (9.2 – 2008).

Para o desempenho produtivo foi realizado um modelo que incluiu o efeito randômico dos blocos, blocos x tratamentos x período e os efeitos fixos do

tratamento e todas as interações entre eles. Contrastes ortogonais polinomiais para os efeitos lineares foram usados para decompor o efeito do tratamento e do tempo em contrastes de graus de liberdade simples.

6. RESULTADOS

6.1. DESEMPENHO PRODUTIVO

A sobrevivência dos peixes no final do estudo foi de 100% em todos os grupos experimentais. Os resultados das médias do desempenho produtivo dos peixes foram submetidos aos tratamentos experimentais são apresentados na **tabela 3**, comparadas pelo teste de contraste de médias (Teste de Tukey) dentro de cada fator ($P < 0,05$). Os peixes alimentados com o óleo essencial de laranja (OEC) não apresentaram diferenças no desempenho produtivo para nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 3. Parâmetros de desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo para os dois períodos de coletas (0-45, 45- 90 e 0-90 dias), alimentadas com dietas suplementadas com óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*).

	Tratamentos (mg kg ⁻¹)	K (%)	PGP (%)	CAA	TCE (%)	GP (g)
0 - 45	0	3,14 ± 0,05	97,78 ± 3,70	0,76 ± 0,03	1,22 ± 0,04	71,85 ± 3,89
	50	3,07 ± 0,04	110,00 ± 4,19	0,76 ± 0,02	1,34 ± 0,04	85,63 ± 1,86
	100	3,15 ± 0,04	110,51 ± 5,77	0,85 ± 0,04	1,32 ± 0,05	87,07 ± 3,81
	200	3,19 ± 0,05	106,72 ± 5,56	0,82 ± 0,04	1,29 ± 0,05	84,94 ± 3,92
	400	3,08 ± 0,05	104,72 ± 4,85	0,80 ± 0,04	1,28 ± 0,05	83,04 ± 3,40
45 - 90	0	3,44 ± 0,04	35,44 ± 2,35	1,07 ± 0,05	0,97 ± 0,05	58,28 ± 2,81
	50	3,45 ± 0,03	35,08 ± 1,49	1,16 ± 0,06	0,92 ± 0,04	59,10 ± 2,66
	100	3,43 ± 0,04	35,24 ± 1,63	1,17 ± 0,05	0,92 ± 0,04	61,23 ± 2,40
	200	3,43 ± 0,03	44,86 ± 2,70	1,39 ± 0,08	1,12 ± 0,06	69,88 ± 3,77
	400	3,48 ± 0,05	38,39 ± 1,42	1,27 ± 0,05	1,00 ± 0,03	63,02 ± 2,32
0 - 90	0	3,44 ± 0,03	157,37 ± 4,95	0,78 ± 0,02	1,08 ± 0,02	123,41 ± 3,11
	50	3,45 ± 0,02	182,00 ± 4,20	0,93 ± 0,02	1,16 ± 0,02	139,54 ± 2,75
	100	3,43 ± 0,03	174,99 ± 5,24	0,88 ± 0,02	1,14 ± 0,02	137,09 ± 3,32
	200	3,43 ± 0,02	192,25 ± 4,97	1,05 ± 0,02	1,22 ± 0,02	153,04 ± 2,56
	400	3,48 ± 0,04	181,03 ± 3,42	0,94 ± 0,02	1,18 ± 0,01	142,64 ± 2,36

Representação dos valores em coluna com as médias ± SE. Valores representados em coluna sem expoentes denotando não haver diferença significativa pelo teste de Tukey (P> 0,05).

Fator de condição (K), percentual de ganho de peso (PGP), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), e ganho de peso (GP).

6.2. HEMATOLOGIA

6.2.1. CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

Um total de pelo menos 100 leucócitos entre monócitos, trombócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos foram contados em microscópio de luz e os percentuais foram calculados. Os resultados das médias da contagem de leucócitos aos 45 dias são apresentados na **tabela 4** e aos 90 dias na **tabela 5**.

Aos 45 dias, o número de monócitos dos tratamentos de 100 e 400 de OEC no tempo 48h, de trombócitos dos tratamentos de 50 e 200 de OEC no tempo 6h, de linfócitos dos tratamentos de 100 e 400 de OEC no tempo 6h, e de 200 de OEC no tempo 48h, e de neutrófilos dos tratamentos de 50 de OEC no tempo 6h, e de 50 de OEC no tempo 24h, foram maiores (Tukey, $p < 0,05$).

Aos 90 dias, o óleo essencial de laranja não influenciou os valores dos neutrófilos, quando comparados com o controle o número de monócitos dos tratamentos de 100 e 200 de OEC no tempo 6h e de 100 e 400 de OEC de no tempo 24h e 48h, de trombócitos do tratamento 400 de OEC no tempo 6h, de 50 de OEC no tempo 24h e de 50, 100 e 400 de OEC no tempo 48h e de linfócitos do tratamento 200 de OEC no tempo 24h e de 50 e 200 de OEC no tempo 48h foram significativamente maiores comparados com o grupo controle (Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 4. Variáveis hematológicas da contagem diferencial de leucócitos em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 45 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

Tempo	Tratamentos (mg kg ⁻¹)	Monócito (%)	Trombócito (%)	Linfócito (%)	Neutrófilo (%)
6H	CN	4,38 ± 0,01 Aa	42,00 ± 0,02 Aab	42,13 ± 0,02 Aa	11,50 ± 0,02 ABb
	0	6,50 ± 0,01 Aa	39,13 ± 0,02 Aab	35,63 ± 0,02 Aab	18,75 ± 0,02 Ab
	50	4,86 ± 0,02 Aa	44,29 ± 0,01 Aa	23,71 ± 0,01 Bc	27,14 ± 0,02 Aa
	100	7,75 ± 0,01 Ba	32,88 ± 0,02 Bb	44,13 ± 0,02 Aa	15,25 ± 0,01 Ab
	200	7,39 ± 0,01 Aa	42,98 ± 0,01 Aa	32,33 ± 0,02 Ab	17,30 ± 0,02 Ab
	400	5,71 ± 0,01 Ba	34,57 ± 0,03 Ab	48,00 ± 0,02 Aa	11,71 ± 0,01 Ab
24H	CN	9,00 ± 0,01 Aa	42,13 ± 0,02 Aa	42,63 ± 0,01 Aa	6,25 ± 0,00 Bb
	0	9,71 ± 0,01 Aa	40,57 ± 0,03 Aa	43,14 ± 0,03 Aa	9,43 ± 0,02 Aab
	50	9,50 ± 0,02 Aa	38,88 ± 0,02 Aa	43,25 ± 0,01 Aa	8,38 ± 0,02 Cab
	100	8,25 ± 0,01 Ba	45,00 ± 0,03 Aa	38,88 ± 0,02 ABa	7,75 ± 0,01 Bab
	200	7,50 ± 0,01 Aa	42,00 ± 0,02 Aa	39,25 ± 0,02 Aa	11,25 ± 0,02 Aa
	400	9,50 ± 0,01 Aa	38,63 ± 0,02 Aa	44,75 ± 0,02 Aa	7,13 ± 0,01 Aab
48H	CN	11,33 ± 0,02 Aab	43,83 ± 0,02 Aa	31,00 ± 0,04 Bb	13,83 ± 0,02 Aa
	0	7,33 ± 0,02 Ab	34,17 ± 0,02 Ab	38,00 ± 0,02 Aab	20,50 ± 0,02 Aa
	50	9,00 ± 0,01 Aab	37,67 ± 0,02 Aab	37,83 ± 0,01 Aab	15,50 ± 0,02 Ba
	100	15,00 ± 0,02 Aa	38,00 ± 0,01 ABab	34,00 ± 0,03 Bab	13,00 ± 0,03 ABa
	200	6,33 ± 0,02 Ab	37,17 ± 0,03 Aab	41,33 ± 0,02 Aa	15,17 ± 0,03 Aa
	400	11,67 ± 0,03 Aa	35,33 ± 0,03 Ab	36,67 ± 0,02 Aab	16,33 ± 0,02 Aa

Representação dos valores em coluna com as médias ± SE. Controle negativo (CN) injetado com 0,5 mL de NaCl 0,65%; demais tratamentos desafiados com *Streptococcus agalactiae*. Comparação entre diferentes tratamentos nas colunas e entre períodos. Letras minúsculas compara os tratamentos do mesmo período. Letras maiúsculas compara os tratamentos entre os períodos do experimento. Letras diferentes denota diferença significativa pelo teste de Tukey (P <0,05).

Tabela 5. Variáveis hematológicas da contagem diferencial de leucócitos em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 90 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

Tempo	Tratamentos (mg kg ⁻¹)	Monócito (%)	Trombócito (%)	Linfócito (%)	Neutrófilo (%)
6H	CN	9,67 ± 0,03 Cab	41,00 ± 0,02 Aab	42,50 ± 0,01 Aa	6,83 ± 0,01 Aa
	0	18,67 ± 0,04 Ba	34,50 ± 0,04 Ab	37,17 ± 0,02 Aab	9,83 ± 0,02 Aa
	50	9,33 ± 0,02 Bb	41,83 ± 0,03 Aab	37,33 ± 0,03 Aab	11,50 ± 0,02 Aa
	100	10,67 ± 0,02 Ca	38,33 ± 0,02 Ab	37,67 ± 0,03 Aab	13,33 ± 0,02 Aa
	200	14,14 ± 0,03 Aa	39,29 ± 0,05 Aab	36,86 ± 0,05 Aab	9,86 ± 0,01 Aa
	400	8,33 ± 0,02 Cb	49,33 ± 0,08 Aa	33,83 ± 0,04 Ab	8,50 ± 0,02 Aa
24H	CN	22,88 ± 0,03 Ba	41,00 ± 0,03 Aab	30,63 ± 0,01 Ab	5,50 ± 0,02 Aa
	0	25,25 ± 0,02 Ba	37,63 ± 0,01 Ab	29,25 ± 0,02 Ab	8,88 ± 0,02 Aa
	50	9,00 ± 0,03 Bb	49,00 ± 0,04 Aa	34,88 ± 0,02 Aab	7,13 ± 0,02 Aa
	100	21,57 ± 0,04 Ba	43,29 ± 0,03 Aab	28,86 ± 0,03 Ab	6,29 ± 0,01 Aa
	200	7,33 ± 0,02 Ab	44,67 ± 0,02 Aab	41,00 ± 0,02 Aa	7,00 ± 0,02 Aa
	400	22,13 ± 0,03 Ba	44,25 ± 0,02 Aab	26,25 ± 0,02 Ab	8,50 ± 0,01 Aa
48H	CN	39,29 ± 0,03 Aa	47,86 ± 0,03 Aa	8,00 ± 0,01 Bb	4,86 ± 0,01 Aa
	0	45,43 ± 0,02 Aa	31,71 ± 0,01 Ab	14,00 ± 0,02 Bb	8,86 ± 0,01 Aa
	50	17,25 ± 0,03 Ab	40,25 ± 0,02 Aa	33,75 ± 0,02 Aa	8,75 ± 0,02 Aa
	100	44,00 ± 0,02 Aa	42,00 ± 0,02 Aa	8,86 ± 0,01 Bb	5,14 ± 0,01 Aa
	200	15,18 ± 0,02 Ab	37,73 ± 0,02 Aab	35,27 ± 0,01 Aa	11,82 ± 0,02 Aa
	400	42,88 ± 0,02 Aa	41,00 ± 0,02 Aa	9,25 ± 0,01 Bb	7,13 ± 0,01 Aa

Representação dos valores em coluna com as médias ± SE. Controle negativo (CN) injetado com 0,5 mL de NaCl 0,65%; demais tratamentos desafiados com *Streptococcus agalactiae*. Comparação entre diferentes tratamentos nas colunas e entre períodos. Letras minúsculas compara os tratamentos do mesmo período. Letras maiúsculas compara os tratamentos entre os períodos do experimento. Letras diferentes denota diferença significativa pelo teste de Tukey (P <0,05).

6.2.2. SÉRIE VERMELHA

Os resultados das médias do hematócrito (HTC), hemoglobina (HB), contagem total eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), aos 45 dias são apresentados na **tabela 6** e aos 90 dias na **tabela 7**.

Aos 45 dias, os valores de HTC, RBC, VCM, HCM e CHCM não apresentaram diferenças (Tukey - $p < 0,05$).

Aos 90 dias, os valores de RBC e VCM não apresentaram diferenças significativas. Comparando entre os tratamentos, o valor de HB no tratamento 100 de OEC no tempo 24h foi maior que os demais tratamentos deste tempo (Tukey - $p < 0,05$).

Tabela 6. Variável hematológica da série vermelha em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 45 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

Tempo	Tratamentos (mg kg ⁻¹)	HTC (%)		HB (g dL ⁻¹)		RBC (10 ⁶ µL ⁻¹)		VCM (fL)		HCM (pg)		CHCM (g dL ⁻¹)	
6H	CN	36,88 ± 1,04	Ba	9,95 ± 0,51	Aa	2,96 ± 0,19	Aa	125,96 ± 8,20	Aa	33,05 ± 2,20	Aa	27,01 ± 1,22	Aa
	0	38,50 ± 1,22	Aa	9,07 ± 0,75	Aa	3,08 ± 0,19	Aa	130,12 ± 7,39	Aa	32,53 ± 1,77	Aa	23,77 ± 1,32	Aa
	50	38,50 ± 0,94	Aa	10,75 ± 0,69	Aa	3,03 ± 0,12	Aa	127,89 ± 4,17	Aa	35,72 ± 2,50	Aa	27,95 ± 1,76	Aa
	100	38,63 ± 1,36	Aa	10,09 ± 0,53	ABa	2,94 ± 0,13	Aa	133,31 ± 7,24	Aa	35,08 ± 2,82	Aa	26,36 ± 1,68	Aa
	200	36,25 ± 2,14	Aa	10,68 ± 0,50	Aa	2,98 ± 0,11	Aa	121,85 ± 6,65	Aa	36,60 ± 3,01	Aa	31,05 ± 4,02	Aa
	400	39,63 ± 1,50	Aa	9,09 ± 0,25	Aa	3,13 ± 0,18	Aa	125,01 ± 6,93	Aa	29,15 ± 1,49	Aa	23,05 ± 0,68	Aa
24H	CN	46,57 ± 3,37	Aa	9,61 ± 0,59	Aa	2,99 ± 0,10	Aa	150,86 ± 12,65	Aa	31,96 ± 2,59	Aa	21,38 ± 2,36	Aa
	0	41,00 ± 0,87	Aa	9,00 ± 0,18	Aa	3,40 ± 0,15	Aa	122,10 ± 5,42	Aa	26,82 ± 1,22	Aa	21,97 ± 0,20	Aa
	50	39,88 ± 0,91	Aa	10,70 ± 0,54	Aa	3,18 ± 0,24	Aa	129,43 ± 7,87	Aa	35,46 ± 3,90	Aa	27,05 ± 1,79	Aa
	100	40,50 ± 1,70	Aa	10,84 ± 0,49	Aa	3,09 ± 0,33	Aa	151,51 ± 31,01	Aa	38,47 ± 5,09	Aa	27,27 ± 2,08	Aa
	200	38,75 ± 1,41	Aa	9,39 ± 0,27	Aa	3,03 ± 0,12	Aa	129,28 ± 6,89	Aa	31,32 ± 1,46	Aa	24,44 ± 1,07	Aa
	400	42,50 ± 2,20	Aa	9,95 ± 0,61	Aa	3,38 ± 0,13	Aa	126,70 ± 7,75	Aa	29,45 ± 1,50	Aa	23,73 ± 1,76	Aa
48H	CN	34,63 ± 1,29	Ba	8,03 ± 0,22	Aa	2,70 ± 0,11	Aa	128,69 ± 4,01	Aa	30,00 ± 1,29	Aa	23,33 ± 0,75	Aa
	0	37,88 ± 1,51	Aa	8,63 ± 0,35	Aa	3,20 ± 0,07	Aa	122,05 ± 2,52	Aa	27,73 ± 0,69	Aa	22,80 ± 0,40	Aa
	50	40,25 ± 1,13	Aa	9,18 ± 0,41	Aa	2,86 ± 0,11	Aa	139,77 ± 4,09	Aa	32,41 ± 2,26	Aa	22,95 ± 1,31	Aa
	100	40,88 ± 1,79	Aa	8,50 ± 0,25	Ba	2,97 ± 0,10	Aa	141,85 ± 7,06	Aa	28,46 ± 1,46	Aa	20,24 ± 0,57	Aa
	200	36,75 ± 1,26	Aa	8,72 ± 0,18	Aa	2,99 ± 0,16	Aa	123,77 ± 4,07	Aa	29,84 ± 1,98	Aa	23,92 ± 0,96	Aa
	400	39,13 ± 1,03	Aa	8,55 ± 0,23	Aa	3,08 ± 0,08	Aa	124,99 ± 4,65	Aa	27,66 ± 1,23	Aa	21,88 ± 0,41	Aa

Representação dos valores em coluna com as médias ± SE. Controle negativo (CN) injetado com 0,5 mL de NaCl 0,65%; demais tratamentos desafiados com *Streptococcus agalactiae*. Comparação entre diferentes tratamentos nas colunas e entre períodos. Letras minúsculas compara os tratamentos do mesmo período. Letras maiúsculas compara os tratamentos entre os períodos do experimento. Letras diferentes denota diferença significativa pelo teste de Tukey (P <0,05). Hematócrito (HTC), hemoglobina (HB), contagem total eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

Tabela 7. Variável hematológica da série vermelha em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 90 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

Tempo	Tratamentos (mg kg ⁻¹)	HTC (%)		HB (g dL ⁻¹)		RBC (10 ⁶ µL ⁻¹)		VCM (fL)		HCM (pg)		CHCM (g dL ⁻¹)	
6H	CN	40,50 ± 1,02	Aa	9,06 ± 0,41	Ba	3,36 ± 0,13	Aa	121,37 ± 4,98	Aa	27,12 ± 1,34	Ba	22,33 ± 0,57	Ba
	0	37,33 ± 0,88	Aab	7,72 ± 0,13	Aa	2,98 ± 0,16	Aa	126,24 ± 10,14	Aa	26,07 ± 1,84	Aa	20,68 ± 0,26	Aa
	50	30,40 ± 1,69	Bb	7,30 ± 0,51	Ba	2,47 ± 0,21	Aa	125,13 ± 7,90	Aa	30,27 ± 2,83	Aa	24,35 ± 2,33	Aa
	100	34,83 ± 1,64	Aab	7,84 ± 0,55	Ba	2,60 ± 0,19	Aa	137,04 ± 10,65	Aa	31,18 ± 3,52	Ba	22,58 ± 1,31	Ba
	200	32,25 ± 1,65	Bab	6,56 ± 0,54	Ba	2,91 ± 0,15	Aa	111,23 ± 4,08	Aa	22,68 ± 1,92	Aa	20,28 ± 1,04	Aa
	400	34,50 ± 1,48	Aab	7,25 ± 0,25	Ba	2,75 ± 0,12	Aa	127,20 ± 9,03	Aa	26,45 ± 0,61	Aa	21,30 ± 1,51	Aa
24H	CN	35,63 ± 1,08	Aa	13,59 ± 0,44	Aa	3,37 ± 0,30	Aa	111,71 ± 13,72	Aa	43,03 ± 3,91	Aa	38,41 ± 1,72	Aa
	0	39,38 ± 0,94	Aa	9,27 ± 0,23	Ab	3,50 ± 0,33	Aa	114,25 ± 9,90	Aa	27,55 ± 2,92	Ab	23,57 ± 0,54	Ab
	50	40,75 ± 1,06	Aa	10,27 ± 0,49	Ab	2,84 ± 0,11	Aa	144,66 ± 5,21	Aa	36,51 ± 2,02	Aab	25,21 ± 1,00	Ab
	100	38,75 ± 0,75	Aa	14,70 ± 0,49	Aa	3,29 ± 0,21	Aa	122,36 ± 9,04	Aa	44,98 ± 2,15	Aa	38,21 ± 2,04	Aa
	200	40,75 ± 0,75	Aa	10,12 ± 0,27	Ab	3,18 ± 0,19	Aa	132,00 ± 9,27	Aa	32,84 ± 2,47	Ab	24,86 ± 0,65	Ab
	400	35,25 ± 1,13	Aa	10,00 ± 0,96	Ab	3,20 ± 0,24	Aa	114,21 ± 7,90	Aa	32,88 ± 5,99	Aab	28,41 ± 2,54	Ab
48H	CN	36,60 ± 3,26	Aa	7,25 ± 0,85	ABa	2,51 ± 0,26	Aa	144,52 ± 6,92	Aa	27,53 ± 4,69	Ba	20,74 ± 3,25	Ba
	0	36,38 ± 1,21	Aa	8,51 ± 0,29	Aa	3,12 ± 0,20	Aa	117,57 ± 5,34	Aa	27,14 ± 1,46	Aa	23,48 ± 0,77	Aa
	50	37,50 ± 1,45	ABa	8,30 ± 0,32	ABa	3,03 ± 0,14	Aa	127,00 ± 5,50	Aa	27,84 ± 1,56	Aa	22,21 ± 0,61	Aa
	100	41,63 ± 1,38	Aa	8,32 ± 0,57	ABa	2,91 ± 0,18	Aa	147,83 ± 12,80	Aa	29,08 ± 2,02	Ba	20,28 ± 1,72	Ba
	200	36,64 ± 1,13	ABa	8,14 ± 0,21	ABa	3,14 ± 0,17	Aa	120,83 ± 6,92	Aa	26,42 ± 1,22	Aa	22,44 ± 0,93	Aa
	400	36,38 ± 1,77	Aa	7,91 ± 0,29	ABa	2,96 ± 0,16	Aa	125,73 ± 10,67	Aa	27,17 ± 1,67	Aa	22,02 ± 1,12	Aa

Representação dos valores em coluna com as médias ± SE. Controle negativo (CN) injetado com 0,5 mL de NaCl 0,65%; demais tratamentos desafiados com *Streptococcus agalactiae*. Comparação entre diferentes tratamentos nas colunas e entre períodos. Letras minúsculas compara os tratamentos do mesmo período. Letras maiúsculas compara os tratamentos entre os períodos do experimento. Letras diferentes denota diferença significativa pelo teste de Tukey (P <0,05). Hematócrito (HTC), hemoglobina (HB), contagem total eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

6.2.3. ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE LEUCÓCITOS

A atividade respiratória de leucócitos, avaliada pela oxidação do corante por espécies reativas de oxigênio (ERO`s) produzidas por leucócitos aos 45 dias são apresentados na **tabela 8** e aos 90 dias na **tabela 9**.

Aos 45 dias, o tempo 24h não apresentou diferença entre os tratamentos (Tukey - $p < 0,05$). Comparando entre tempos, após seis horas do desafio os peixes apresentaram os menores valores, comparado com os demais tempos (Tukey - $p < 0,05$). Comparando os tratamentos, no tempo 6h o tratamento de 400 de OEC e no tempo 48h os tratamentos de 200 e 400 de OEC foram maiores (Tukey - $p < 0,05$) que os demais tratamentos do grupo.

Aos 90 dias, não foi possível observar diferenças entre os tempos (Tukey - $p < 0,05$). Todos peixes tratados com o óleo essencial de laranja foram maiores em relação aos controles, com exceção dos tratamentos de 50 e 100 de OEC no tempo 48h, que foram também semelhantes com o controle positivo (0 mg kg^{-1}) (Tukey - $p < 0,05$).

Tabela 8. Análise da atividade respiratória de leucócitos em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 45 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

Tempo	Tratamentos (mg kg ⁻¹)	BURST (DO)	
6H	CN	0,28 ± 0,01	Bc
	0	0,30 ± 0,01	Bbc
	50	0,41 ± 0,02	Babc
	100	0,40 ± 0,04	Babc
	200	0,44 ± 0,01	Bab
	400	0,44 ± 0,05	Ba
24H	CN	0,58 ± 0,01	Aa
	0	0,59 ± 0,01	Aa
	50	0,65 ± 0,02	Aa
	100	0,61 ± 0,02	Aa
	200	0,64 ± 0,01	Aa
	400	0,63 ± 0,01	Aa
48H	CN	0,52 ± 0,02	Ac
	0	0,68 ± 0,05	Aab
	50	0,60 ± 0,02	Aabc
	100	0,57 ± 0,04	Abc
	200	0,72 ± 0,02	Aa
	400	0,67 ± 0,05	Aa

Representação dos valores em coluna com as médias ± SE. Controle negativo (CN) injetado com 0,5 mL de NaCl 0,65%; demais tratamentos desafiados com *Streptococcus agalactiae*. Comparação entre diferentes tratamentos nas colunas e entre períodos. Letras minúsculas compara os tratamentos do mesmo período. Letras maiúsculas compara os tratamentos entre os períodos do experimento. Letras diferentes denota diferença significativa pelo teste de Tukey (P <0,05).

Tabela 9. Análise da atividade respiratória de leucócitos em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo essencial de laranja durante 90 dias e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

Tempo	Tratamentos (mg kg ⁻¹)	BURST (DO)	
6H	CN	0,25 ± 0,08	Ab
	0	0,43 ± 0,02	Ab
	50	0,73 ± 0,03	Aa
	100	0,74 ± 0,01	Aa
	200	0,79 ± 0,04	Aa
	400	0,76 ± 0,03	Aa
24H	CN	0,21 ± 0,04	Ac
	0	0,45 ± 0,01	Ab
	50	0,92 ± 0,04	Aa
	100	0,81 ± 0,04	Aa
	200	0,93 ± 0,02	Aa
	400	0,76 ± 0,03	Aa
48H	CN	0,22 ± 0,01	Ac
	0	0,48 ± 0,02	Ab
	50	0,66 ± 0,03	Aab
	100	0,65 ± 0,03	Aab
	200	0,75 ± 0,02	Aa
	400	0,68 ± 0,03	Aa

Representação dos valores em coluna com as médias ± SE. Controle negativo (CN) injetado com 0,5 mL de NaCl 0,65%; demais tratamentos desafiados com *Streptococcus agalactiae*. Comparação entre diferentes tratamentos nas colunas e entre períodos. Letras minúsculas compara os tratamentos do mesmo período. Letras maiúsculas compara os tratamentos entre os períodos do experimento. Letras diferentes denota diferença significativa pelo teste de Tukey (P <0,05).

7. DISCUSSÃO

Há poucos relatos de estudos para avaliar a eventual aplicação do óleo essencial de laranja como suplemento promotor de crescimento. Uma grande vantagem da utilização desse fitoterápico é o fato de serem considerados produtos internacionalmente “reconhecidos como geralmente seguros”, podendo ser uma alternativa ao uso de antibióticos, devido às suas propriedades biológicas antimicrobianas e antissépticas. As propriedades antimicrobianas e aromáticas desse fitoterápico são popularmente reconhecidas e utilizadas pelas indústrias alimentícias como conservante, conferindo agradável sabor e aroma (ACAR et al., 2015; CHOI, 2006; FISHER; PHILLIPS, 2008; KABARA, 1991; MOREIRA et al., 2005).

O óleo essencial de laranja pode apresentar-se como importante agente promotor de crescimento, entretanto, no presente trabalho não foi possível observar o seu efeito no desempenho produtivo de tilápias-do-Nilo em nenhum dos tempos e tratamentos analisados. A suplementação de dietas contendo diversos óleos essenciais, entre eles o óleo de citros (0, 50, 100, 150 e 200 mg kg⁻¹ de ração), não influenciou no ganho de peso de tilápias-do-Nilo (FRECCIA et al., 2014). Segundo (NAVARRETE et al., 2010) o uso do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), em concentrações menores (0, 5, 10 e 20 mg kg⁻¹ de ração), também não influenciou no desempenho produtivo em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Apesar disso, (ACAR et al., 2015) afirma que a suplementação de dietas contendo do óleo essencial de laranja, em dietas para tilápia-do-Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), em concentração maior (1000 mg kg⁻¹ de ração) do que a utilizada no presente trabalho, demonstrou

melhoras significativas para o ganho de peso, conversão alimentar e no ganho específico comparado com os peixes do controle.

A aquicultura vem sofrendo com os problemas provocados por surtos de doenças, gerando grande preocupação com a saúde dos animais e os prejuízos gerados, portanto, devidas precauções são necessárias para otimizar o crescimento e a produção de peixes com qualidade e segurança (AMLASHI et al., 2011). O fitoterápico é uma alternativa segura e eficaz para solucionar esses problemas, capazes de estimular os mecanismos de defesa inata humoral e celular em peixes (ANDERSON, D.P.; SIWICKI, 1995). Logo, a melhora nos mecanismos de defesa possibilita um meio eficiente para o tratamento profilático de enfermidades em peixes, favorecendo os mecanismos imune inato, conseqüentemente, eleva o número os níveis da série branca (JENEY; ANDERSON, 1993). A contagem diferencial de leucócitos indica a proporção dos diferentes leucócitos e é uma ferramenta hematológica convencional muito importante no auxílio diagnóstico de doenças em vertebrados superiores, portanto, esse exame também é utilizado em peixes como importante tratamento de auxílio diagnóstico do estado imunológico (BLAXHALL; DAISLEY, 1973; STOSKOPF, 1993).

A contagem diferencial mostrou que aos 45 dias houve predominância de linfócitos, seguido de trombócitos, neutrófilos e monócitos, e aos 90 dias houve predominância de trombócitos, seguido de linfócitos, monócitos e neutrófilos. Os valores da contagem diferencial observados neste trabalho são corroborados em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (BOZZO et al., 2007; DA SILVA CLAUDIANO et al., 2013) e em tilápia-do-Nilo (REQUE et al., 2010), ambos desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

A utilização do óleo essencial de laranja em peixes no presente trabalho aumentou o leucograma dos animais desafiados com *Streptococcus agalactiae*, principalmente no segundo período de coleta. A utilização do β -glucano como imunestimulante em carpas (*Cyprinus carpio*) desafiadas com *Aeromonas hydrophila* também demonstrou aumento do valor do número dos diferentes tipos de leucócitos nos peixes (SELVARAJ; SAMPATH; SEKAR, 2006). Os tempos pré-determinados pós-desafio nos dois períodos analisados do presente estudo permitiu observar a influencia sobre os valores das diferentes células. Em geral, foi possível observar que um progresso nos valores para monócitos, em contrapartida, os valores para os linfócitos regrediu, e de neutrófilos teve menor pico as 24 h.

A utilização de imunoestimulantes melhora o desempenho imunológico em peixes, elevando o número da atividade dos monócitos (CAIN et al., 2003). Os monócitos são células da série branca que tem capacidade de migrar para o foco da inflamação, diferenciam-se em macrófagos teciduais, controlando a inflamação e removendo o tecido morto. Essas células fagocitárias são capazes de proteger os tecidos e prevenir a ação dos agentes contaminantes (NINNEMANN, 1988; SCHALL et al., 1990). No presente trabalho, o número de monócitos do tratamento de 100 OEC demonstrou ter sido o mais eficiente em ambos os tempos avaliados, seguido pelos tratamentos de 400 e 200 OEC. (TAVARES-DIAS; MORAES; MARTINS, 2008) afirmam que distúrbios hematológicos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) parasitados por *Anacanthorus penilabiatu*s e *Piscinoodinium pillulare*, também provocaram alterações no número de monócitos nos peixes. Os distúrbios inflamatórios ou infecções causadas pela invasão microbiana ou lesão tecidual geram reações químicas atrativas que, após o

reconhecimento e processamento, estimulam a migração dos monócitos para o local, provocando a elevação dos seus valores no organismo (SECOMBES; FLETCHER, 1992).

Os trombócitos apesar de não serem considerados leucócitos são responsáveis pelo controle da hemostasia e coagulação, um mecanismo de defesa para evitar a perda de sangue. Além disso, desempenham importante papel na atividade fagocitária (BURROWS; FLETCHER; MANNING, 2001). A suplementação de dietas de tilápia-do-Nilo com o óleo essencial de laranja do presente estudo influenciou o número de trombócitos, principalmente aos 90 dias. O tratamento de 50 OEC foi o mais eficiente, seguido pelo tratamento de 400 OEC. A utilização do alho (*Allium sativum*) (MARTINS et al., 2002), assim como, β -glucano, em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014), desafiados bactérias, mostrou que esses imunoestimulantes também influenciaram no número de trombócitos.

Os linfócitos em peixes são encontrados em grande número no sangue, e em maior concentração nos órgão linfóides, desempenhando papel semelhante aos linfócitos imunocompetentes em vertebrados superiores (ELLIS, 2001; WARDLE, 1971). A utilização do óleo essencial de laranja, principalmente no tratamento de 200 OEC, influenciou os níveis de linfócitos no presente trabalho, no entanto, ao contrário do observado com monócitos e trombócitos, esses índices decrescem ao longo dos tempos coletados. O stress nos peixes é um fator marcante na diminuição do número de linfócitos (linfopenia) (ENGELSMA et al., 2003). O resultado da linfopenia observado após o stress provocado em carpas (*Cyprinus carpio*) (JAHANBAKHSI et al., 2014) corroboram os resultados deste estudo. Alterações no leucograma podem estar associadas a vários fatores

externos e internos, que causam variações anormais, muitas vezes provocadas pela hipóxia ou até mesmo pelo estresse causado pelo manejo dos peixes (CLAUSS; DOVE; ARNOLD, 2008; HEATH, 1995; HOUSTON, 1990; WEDEMEYER; BARTON; MCLEAY, 1990).

Os neutrófilos são células circulantes da série branca, responsáveis pela defesa do organismo, migrando para o foco da inflamação. A resposta imune específica é induzida por estimulação imunogênica e inclui a produção de anticorpos, resultando no aumento do número de células produtoras de anticorpos. Uma vez que os neutrófilos são recrutados para o tecido subjacente, encontram o microrganismo e os fagocitam. O recrutamento dos neutrófilos para os locais da lesão tecidual ou infecção é uma marca registrada da resposta inflamatória. A utilização de fitoterápicos pode induzir atividades elevadas nos mecanismos de defesa não específicos, tais como o aumento da atividade oxidativa de neutrófilos (KEPKA et al., 2014). A suplementação de dietas de tilápia-do-Nilo com o óleo essencial de laranja do presente estudo influenciou o número de neutrófilos aos 45 dias do presente experimento, exclusivamente nos tratamentos de 50 OEC no tempo 6h e no tratamento de 200 OEC no tempo 24h. Dietas contendo extratos aquosos de visco (*Viscum album*), urtiga (*Urtica dioica*) e gengibre (*Zingiber officinale*), também demonstraram efeito sobre os neutrófilos em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (DÜGENCI; ARDA; CANDAN, 2003). A função dos neutrófilos ainda é uma questão contestável, no entanto, é provável que o aumento dessas células possam exercer importante papel na fagocitose e na explosão respiratória mediada atividade bactericida (DALMO; INGEBRIGTSEN; BØGWALD, 1997; KEMENADE et al., 1994; LAMAS; ELLIS, 1994). A utilização de imunoestimulantes em peixe tais como Ergosan (PEDDIE;

ZOU; SECOMBES, 2002), β -glucana (ANDERSON, DOUGLAS P, 1992; JENEY; ANDERSON, 1993), escleroglucano, zimosano e uma gama de outros polissacáridos (WANG; WANG, 1997), resultou na ativação e aumento no número de neutrófilos, modulando o número de células positivas do NBT.

Os parâmetros da série vermelha aos 45 dias do início do presente estudo não foram influenciados com a utilização do óleo essencial de laranja em dieta de tilápia-do-Nilo desafiada com *Streptococcus agalactiae*, no entanto, aos 90 dias do início do experimento foi possível observar diferença significativa para o tratamento de 100 OEC para a hemoglobina e, conseqüentemente, para a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina média, comparando com os demais tratamentos. A suplementação de dietas contendo óleo essencial de laranja (1000 mg kg⁻¹ de ração) para tilápia-do-Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) desafiadas com *Streptococcus inae*, também provou ter provocado efeito no valor da hemoglobina (ACAR et al., 2015).

Os tempos de coletas pré-estabelecidos após o desafio com *Streptococcus agalactiae*, permitiram avaliar neste experimento a evolução dos valores hematológicos nos peixes. Os valores de hemoglobina, hematócrito, HCM e CHVM, em geral, evidenciaram o pico máximo dos valores no tempo de 24 h.

Os imunoestimulantes podem melhorar os mecanismos de defesa inata em peixes, aumentando a atividade fagocitária, que por sua vez tem a capacidade exterminar os agentes patogênicos, que são englobados em vacúolos, que liberam agentes oxidantes microbicidas. O início do processo de fagocitose é marcado com o aumento do consumo de oxigênio celular, em seguida, ocorrem à produção de superóxido e peróxido de hidrogênio, espécies reativas de oxigênio

(ROS), que desempenham papel importante na eliminação do agente estranho. Esse processo é conhecido como atividade respiratória de leucócitos ou “burst oxidativo”, e exerce importante papel para o sistema imune (ANDERSON, DOUGLAS P, 1992; BLAZER; ANKLEY; FINCO-KENT, 1990; BLAZER; WOLKE, 1984; ELLIS, 2001; ROBERTSEN; ENGSTAD; JORGENSEN, 1994; SAKAI, MASAHIRO, 1999; SIWICKI, A. K.; ANDERSON; RUMSEY, 1994; VERA-JIMENEZ et al., 2013; VERLHAC et al., 1998; YEH et al., 2009).

A utilização do óleo essencial de laranja em dieta de tilápia-do-Nilo desafiada com *Streptococcus agalactiae* no presente estudo demonstrou eficiência na atividade respiratória dos leucócitos em ambos os períodos analisados. Aos 90 dias do experimento não foi possível observar diferenças entre os tempos de coleta, no entanto, aos 45 dias do experimento no tempo de 6h foram constatados os menores valores.

Diversos imunoestimulantes tradicionais, como o levamisol (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006), glucano (BARROS et al., 2014) e probióticos (ALY et al., 2008) são utilizados como alternativa para melhorar a atividade imune em peixes, estimulando a ação dos fagócitos (CHOUDHURY et al., 2005). O processo de fagocitose elimina os microorganismos utilizando moléculas reativas contendo oxigênio (EROs), produzidas durante a atividade respiratória de leucócitos (AFONSO et al., 1998). A utilização de óleo essencial de *C. sinensis* em dietas para tilápia-do-Nilo no presente estudo mostrou que nos dois períodos analisados todos os tratamentos foram maiores em relação ao grupo controle. Os tratamentos de 100 e 50 OEC demonstraram efeito significativo para essa variável, no entanto, foi possível observar que o tratamento de 400 OEC, seguido pelo tratamento de 200 OEC, obtiveram os maiores valores para a atividade

respiratória de leucócito. A utilização de óleo essencial de *C. sinensis* em dietas para tilápia-do-Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) (ACAR et al., 2015) e o dos óleos essenciais de zataria (*Zataria multiflora*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) em dietas de carpa (*Cyprinus carpio*) (SHEIKHZADEH et al., 2011), também confirmaram atividade respiratória de leucócitos.

8. CONCLUSÃO

O uso do óleo essencial de laranja em dietas para tilápia-do-Nilo desafiadas com *Streptococcus agalactiae* demonstrou potencial melhora nas variáveis hematológicas e na atividade respiratória de leucócitos sanguíneo, podendo ser um caminho alternativo ao uso de antibióticos, no entanto, esse fitoterápico não demonstrou efeito sobre o desempenho produtivo dos peixes.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do presente trabalho não ter demonstrado efeito no desempenho produtivo, ao decorrer do experimento, foi possível notar que os peixes tratados com dietas contendo o óleo essencial de laranja apresentaram valores maiores de ganho de peso e do percentual de ganho de peso, principalmente para o tratamento de 200 OEC, cerca de 15 – 20% maior que o grupo controle. (MORAES et al., 2009) afirmam que a utilização do óleo essencial de *Citrus aurantium* na dieta de ratos, em doses semelhantes ao nosso estudo, teve maior aceitação dos animais e maior atividade gastroprotetora, principalmente, devido à formação de muco na cavidade estomacal. Diversos fitoterápicos demonstraram relatos de estimulação do apetite em peixes, promovendo o ganho de peso (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; HEO, 2012; PAVARAJ et al., 2011; TAKAOKA et al., 2011). Portanto, experimentos futuros são necessários para avaliar o efeito estimulante de apetite do óleo essencial de laranja em dietas para peixes.

Por menor que seja o incremento no ganho de peso, o lucro final agregado na produção de peixes pode aumentar consideravelmente (REINITZ, 1983). Portanto, apesar do presente trabalho não ter demonstrar efeito sobre o desempenho produtivo em tilápia-do-Nilo suplementada com óleo essencial de laranja, a diferença observada no ganho de peso, provavelmente provocada pelo seu mecanismo atrativo, estimulando o consumo de alimento, pode representar uma alternativa viável e lucrativa na produção de peixes.

10. BIBLIOGRAFIA

ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 03, p. 403-412, 2005.

ACAR, Ü. et al. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, v. 437, p. 282-286, 2015.

AFONSO, A. et al. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. **Diseases of aquatic organisms**, v. 34, n. 1, p. 27-37, 1998.

ALÇIÇEK, A.; BOZKURT, M.; ÇABUK, M. The effect of an essential oil combination derived from selected herbs growing wild in Turkey on broiler performance. **South African Journal of Animal Science**, v. 33, n. 2, p. 89-94, 2004.

ALY, S. M. et al. 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.

AMAL, M.; ZAMRI-SAAD, M. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, n. 2, p. 195-206, 2011.

AMLASHI, A. S. et al. Effect of dietary vitamin E on growth, muscle composition, hematological and immunological parameters of sub-yearling beluga *Huso huso* L. **Fish & shellfish immunology**, v. 30, n. 3, p. 807-814, 2011.

AMMERMAN, C.; HENRY, P. Citrus and vegetable products for ruminant animals. **Proceedings, Alternative Feeds for Dairy and Beef Cattle, St Louis, MO**, p. 103-110, 1991.

ANAGNOSTOPOULOU, M. A. et al. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food chemistry**, v. 94, n. 1, p. 19-25, 2006.

ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 281-307, 1992.

ANDERSON, D. P.; SIWICKI, A. K. **Basic hematology and serology for fish health programs**. Manila, Phillipines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 1995.

AREGHEORE, E. M. Chemical composition and nutritive value of some tropical by-product feedstuffs for small ruminants—in vivo and in vitro digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 85, n. 1, p. 99-109, 2000.

ARIAS, B. A.; RAMÓN-LACA, L. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 89-95, 2005.

AUSTIN, B. **Infectious disease in aquaculture: Prevention and control**. Elsevier, 2012. ISBN 0857095730.

AWAD, E.; AUSTIN, D.; LYNDON, A. R. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture**, v. 388, p. 193-197, 2013.

AZIZOĞLU, A.; CENGİZLER, İ. An investigation on determination of some haematologic parameters in healthy *Oreochromis niloticus* (L.). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 20, n. 6, p. 425-431, 1996.

BADWEY, J. A.; KARNOVSKY, M. L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. **Annual review of biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 695-726, 1980.

BARROS, M. M. et al. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. **Fish & shellfish immunology**, v. 39, n. 2, p. 188-195, 2014.

BAUER, A. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BELARDELLI, F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. **Apmis**, v. 103, n. 1-6, p. 161-179, 1995.

BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 4505-4515, 1997.

BENENCIA, F.; COURREGES, M. In vitro and in vivo activity of eugenol on human herpesvirus. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 7, p. 495-500, 2000.

BILEN, S.; BULUT, M.; BILEN, A. M. Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & shellfish immunology**, v. 30, n. 2, p. 451-455, 2011.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1484-1506, 2014.

BILLER, J. **Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila* em pacu alimentado com ração suplementada com 1, 3 β -glucano. 2008. 114p.** 2008. Dissertação (Mestrado)—Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal

BLAXHALL, P.; DAISLEY, K. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, v. 5, n. 6, p. 771-781, 1973.

BLAZER, V.; ANKLEY, G.; FINCO-KENT, D. Dietary influences on disease resistance factors in channel catfish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 13, n. 1, p. 43-48, 1990.

BLAZER, V.; WOLKE, R. The effects of α -tocopherol on the immune response and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Aquaculture**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 1984.

BLUMA, R. et al. Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. **Journal of applied microbiology**, v. 105, n. 1, p. 203-214, 2008.

BONDAD-REANTASO, M. G. et al. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary parasitology**, v. 132, n. 3, p. 249-272, 2005.

BOONYARATPALIN, S. et al. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune response, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Diseases in Asian Aquaculture II. Fish Health Section. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society**, p. 469-477, 1995.

BORGMANN, S. et al. Two episodes of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 207, n. 4, p. 386-389, 2004.

BOXALL, A. et al. Veterinary medicines in the environment. In: (Ed.). **Reviews of environmental contamination and toxicology**: Springer, 2004. p.1-91. ISBN 0387404023.

BOZZO, F. et al. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 2, p. 302-308, 2007.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1, p. 1-14, 2010.

BURDOCK, G. A.; CARABIN, I. G. Generally recognized as safe (GRAS): history and description. **Toxicology letters**, v. 150, n. 1, p. 3-18, 2004.

BURROWS, A.; FLETCHER, T.; MANNING, M. Haematology of the turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrastructural, cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, n. 2, p. 77-84, 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CACCIONI, D.; DEANS, S.; RUBERTO, G. Inhibitory effect of citrus fruit essential oil components on *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. **Petria**, v. 5, n. 2, p. 177-181, 1995.

CACCIONI, D. R. et al. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 73-79, 1998.

CAIN, K. D. et al. Immunomodulatory effects of a bacterial-derived β -1, 3 glucan administered to tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in a *Spirulina*-based diet. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 13, p. 1241-1244, 2003.

CANONICO, G. C. et al. The effects of introduced tilapias on native biodiversity. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 15, n. 5, p. 463-483, 2005.

CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. **Biochem. J**, v. 336, p. 395-404, 1998.

CAPONE, D. G. et al. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. **Aquaculture**, v. 145, n. 1, p. 55-75, 1996.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G.; OBERG, C. J. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 5, p. 639-649, 2000.

CHOI, H.-S. Lipolytic effects of citrus peel oils and their components. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 9, p. 3254-3258, 2006.

CHOUHDURY, D. et al. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, n. 3, p. 281-291, 2005.

CHUTIA, M. et al. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 777-780, 2009.

CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D.; ARNOLD, J. E. Hematologic disorders of fish. **Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice**, v. 11, n. 3, p. 445-462, 2008.

COLLIER, H. B. Standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, n. 6, p. 550, 1944.

CONWAY, P.; DIP PHYT, M.; MCPP, D. The consultation in phytotherapy. **Australian Journal of Medical Herbalism**, v. 23, n. 4, p. 193, 2011.

CURNUTTE, J.; BABIOR, B.; KARNOVSKY, M. Fluoride-mediated activation of the respiratory burst in human neutrophils. A reversible process. **Journal of Clinical Investigation**, v. 63, n. 4, p. 637, 1979.

DA SILVA CLAUDIANO, G. et al. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: Participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 5, p. 1057-1062, 2013.

DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. **Practical haematology**. Edinburgh; New York: Churchill Livingstone, 1991. ISBN 0443039526.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of immunological methods**, v. 232, n. 1, p. 3-14, 1999.

DALMO, R.; INGEBRIGTSEN, K.; BØGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **Journal of Fish Diseases**, v. 20, n. 4, p. 241-273, 1997.

DAVIDSON, P.; NAIDU, A. Phyto-phenols. **Natural food antimicrobial systems**, p. 265-294, 2000.

DEANS, S.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International journal of food microbiology**, v. 5, n. 2, p. 165-180, 1987.

DIAB, A. S. et al. Effect of garlic, black seed and Biogen as immunostimulants on the growth and survival of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae), and their response to artificial infection with *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Aquatic Science**, v. 33, n. 1, p. 63-68, 2008.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 69, n. 1, p. 25-28, 1994.

DORMAN, H.; DEANS, S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DÜGENCI, S. K.; ARDA, N.; CANDAN, A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 1, p. 99-106, 2003.

DUNCAN, P. L.; KLESIUS, P. H. Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 8, n. 3, p. 241-248, 1996.

DUŠAN, F. et al. Essential oils—their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 8, p. 1435-1445, 2006.

EBRAHIMI, A. et al. Effect of different levels of dried sweet orange (*Citrus sinensis*) peel on broiler chickens growth performance. **Archiv Tierzucht**, v. 2, p. 11-17, 2013.

EL-DAKAR, A. et al. Use of Dried Basil Leaves as a Feeding Attractant for Hybrid Tilapia, *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*, Fingerlings.

ELLIS, A. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, n. 8, p. 827-839, 2001.

ENGELSMA, M. Y. et al. Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Fish & shellfish immunology**, v. 15, n. 5, p. 397-410, 2003.

ESPINA, L. et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011.

ESWARAN, M. B. et al. Gastroprotective activity of *Cinnamomum tamala* leaves on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 537-540, 2010.

EVANS, J. et al. Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, n. 9, p. 505-513, 2002.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**: Rome: 209 p. 2012.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**: Rome: 223 p. 2014.

FEARON, D. T. Seeking wisdom in innate immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 323-324, 1997.

FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 50-54, 1996.

FISCHER, U.; KOPPANG, E. O.; NAKANISHI, T. Teleost T and NK cell immunity. **Fish & shellfish immunology**, v. 35, n. 2, p. 197-206, 2013.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in food science & technology**, v. 19, n. 3, p. 156-164, 2008.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1343-1349, 2009.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 6, p. 1232-1240, 2006.

FLAMINI, G.; TEBANO, M.; CIONI, P. L. Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of *Citrus limon*. **Analytica chimica acta**, v. 589, n. 1, p. 120-124, 2007.

FLETCHER, T. C.; SECOMBES, C. J. Immunology of fish. **eLS**, 2010.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, v. 199, n. 3, p. 197-227, 2001.

FRECCIA, A. et al. Essential oils in the initial phase of broodstock diets of Nile tilapia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2014.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 147-159, 1975.

FURUYA, W. M. et al. Use of ideal protein concept for precision formulation of amino acid levels in fish-meal-free diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture Research**, v. 35, n. 12, p. 1110-1116, 2004.

GOLDBURG, R.; NAYLOR, R. Future seascapes, fishing, and fish farming. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 3, n. 1, p. 21-28, 2005.

GOLDENFARB, P. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.

GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**, v. 255, n. 1, p. 179-187, 2006.

GRAHAM, L. et al. DISTRIBUTION OF SOME SYNAPTIC TRANSMITTER SUSPECTS IN CAT SPINAL CORD: GLUTAMIC ACID, ASPARTIC ACID, γ -AMINOBUTYRIC ACID, GLYCINE, AND GLUTAMINE*. **Journal of neurochemistry**, v. 14, n. 4, p. 465-472, 1967.

GRÄSLUND, S.; BENGTSSON, B.-E. Chemicals and biological products used in south-east Asian shrimp farming, and their potential impact on the environment—a review. **Science of the Total Environment**, v. 280, n. 1, p. 93-131, 2001.

GRAVE, K. et al. Usage of veterinary therapeutic antimicrobials in Denmark, Norway and Sweden following termination of antimicrobial growth promoter use. **Preventive veterinary medicine**, v. 75, n. 1, p. 123-132, 2006.

GREATHEAD, H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 2, p. 279-290, 2003.

GROUP, W. B. **World Development Indicators 2014**. World Bank Publications, 2014. ISBN 0821389858.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M.-S. Effect of Inonotus obliquus enriched diet on hematology, immune response, and disease protection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, v. 344, p. 48-53, 2012.

HARRIS, J. et al. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 282-286, 2001.

HAYA, K.; BURRIDGE, L.; CHANG, B. Environmental impact of chemical wastes produced by the salmon aquaculture industry. **ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil**, v. 58, n. 2, p. 492-496, 2001.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. CRC press, 1995. ISBN 0873716329.

HELANDER, I. M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

HON, F.; OLUREMI, O.; ANUGWA, F. The effect of dried sweet orange (*Citrus sinensis*) fruit pulp meal on the growth performance of rabbits. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 8, p. 1150-1155, 2009.

HOUSTON, A. Blood and circulation. **Methods for fish biology**, v. 1990, p. 273-334, 1990.

INCHAROEN, T.; YAMAUCHI, K.; THONGWITTAYA, N. Intestinal villus histological alterations in broilers fed dietary dried fermented ginger. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 94, n. 5, p. e130-e137, 2010.

INGLIS, V.; ROBERTS, R. J.; BROMAGE, N. R. **Bacterial diseases of fish**. Blackwell Scientific Publications, 1993. ISBN 0632034971.

INOBUCHI, T. et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD (P) H oxidase. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. suppl 3, p. S227-S232, 2003.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 565-573, 2001.

JAHANBAKHSI, A. et al. Hematological and biochemical responses of common carp *Cyprinus carpio* to direct infusion of crude oil. **Comparative Clinical Pathology**, v. 23, n. 3, p. 799-803, 2014.

JANEWAY, C. A. et al. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. Churchill Livingstone, 2001.

JANEWAY JR, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 197-216, 2002.

JENEY, G.; ANDERSON, D. P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 116, n. 4, p. 315-329, 1993.

KABARA, J. Phenols and chelators. **Food preservatives. Blackie: Glasgow**, p. 200-214, 1991.

KARNOVSKY, M. Mitochondrial changes and cytochrome oxidase in the frog nephron. In: (Ed.). **Electron Microscopy**: Academic Press New York and London, v.2, 1962. p.Q-9.

KARNOVSKY, M. L. Metabolic basis of phagocytic activity. **Physiological reviews**, v. 42, n. 1, p. 143-168, 1962.

KEMENADE, B. et al. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). **The Journal of experimental biology**, v. 187, n. 1, p. 143-158, 1994.

KEPKA, M. et al. Mechanisms involved in apoptosis of carp leukocytes upon in vitro and in vivo immunostimulation. **Fish & shellfish immunology**, v. 39, n. 2, p. 386-395, 2014.

KITAO, T.; AOKI, T.; SAKOH, R. Epizootic caused by beta-haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. **Fish Pathology**, v. 15, n. 3/4, p. 301-307, 1981.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: occurrence and biological function. **Peroxidases in chemistry and biology**, v. 1, p. 1-35, 1991.

KLEIN, J. Immunology. In: O'FARRELLY, C. (Ed.). **Blackwell Scientific Publications**. Massachusetts: Elsevier Current Trends, 1991. p.311-334. ISBN 0167-5699.

KUSUDA, R.; SALATI, F. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. **Annual review of fish diseases**, v. 3, p. 69-85, 1993.

LAMAS, J.; ELLIS, A. E. Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 4, n. 3, p. 201-219, 1994.

LANCIOTTI, R. et al. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. **Trends in food science & technology**, v. 15, n. 3, p. 201-208, 2004.

LANGEVIN, C. et al. The antiviral innate immune response in fish: evolution and conservation of the IFN system. **Journal of molecular biology**, v. 425, n. 24, p. 4904-4920, 2013.

LEE, B. J. et al. Effects of dietary supplementation of citrus by-products fermented with a probiotic microbe on growth performance, innate immunity and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). **Journal of fish diseases**, v. 36, n. 7, p. 617-628, 2013.

LEE, J. Y.; GAO, Y. Review of the Application of Garlic, *Allium sativum*, in Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, n. 4, p. 447-458, 2012.

LEWIS, K.; AUSUBEL, F. Focus on antibacterials. **Nature Biotech**, v. 24, n. 12, p. 1453-1602, 2006.

LI, P.; LEWIS, D. H.; GATLIN, D. M. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone*

chrysops× *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 16, n. 5, p. 561-569, 2004.

LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S. M.; PALOU, E. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. **International journal of food microbiology**, v. 99, n. 2, p. 119-128, 2005.

LOSORDO, T. M.; WESTERMAN, P. W. An analysis of biological, economic, and engineering factors affecting the cost of fish production in recirculating aquaculture systems. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 25, n. 2, p. 193-203, 1994.

LOTA, M.-L. et al. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 1, p. 77-104, 2001.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & shellfish immunology**, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.

MAHMOUD, B. S. et al. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 657-666, 2004.

MAK, T. W.; SAUNDERS, M. E. **The immune response: basic and clinical principles**. Academic Press, 2005. ISBN 0080534481.

MALE, D. K.; BROSTOFF, J. **Immunologie**. Elsevier Masson, 2007. ISBN 2842998413.

MARTIN, C. W.; VALENTINE, M. M.; VALENTINE, J. F. Competitive interactions between invasive Nile tilapia and native fish: the potential for altered trophic exchange and modification of food webs. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e14395, 2010.

MARTINO, R. C. et al. Effect of dietary lipid level on nutritional performance of the surubim, *Pseudoplatystoma coruscans*. **Aquaculture**, v. 209, n. 1, p. 209-218, 2002.

MARTINS, M. et al. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) infection in cultivated pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and its haematological effects. **Parasite**, v. 9, n. 2, p. 175-180, 2002.

MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C. W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. **Critical reviews in microbiology**, v. 29, n. 3, p. 191-214, 2003.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 301-305, 2002.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **cell**, v. 91, n. 3, p. 295-298, 1997.

METWALLY, M. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 1, n. 1, p. 56-64, 2009.

MIRGHAED, A.; YADOLLAHI, F. Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae*; the cause of

zoonotic disease in farmed fish. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 12, n. 3, p. 702-716, 2013.

MORAES, T. M. et al. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, n. 3, p. 499-505, 2009.

MOREIRA, M. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 565-570, 2005.

MOUFIDA, S. D.; MARZOUK, B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. **Phytochemistry**, v. 62, n. 8, p. 1283-1289, 2003.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, v. 13, n. 4, p. 289-292, 2002.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. p. 128, 2014. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/files/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%203%ADstico%20MPA%202010.pdf>. Acesso em: 09/03/2015.

MULYANINGSIH, S. et al. Biological activity of the essential oil of *Kadsura longipedunculata* (Schisandraceae) and its major components. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 8, p. 1037-1044, 2010.

NAVARRETE, P. et al. Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 10, p. e667-e678, 2010.

NAYLOR, R.; BURKE, M. Aquaculture and ocean resources: raising tigers of the sea. 2005.

NIEMEGERERS, C.; VERBRUGGEN, F.; JANSSEN, P. Effect of various drugs on carrageenin-induced oedema in the rat hind paw. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 16, n. 12, p. 810-816, 1964.

NINNEMANN, J. L. **Prostaglandins, leukotrienes, and the immune response**. Cambridge University Press, 1988. ISBN 0521334837.

NYCHAS, G. Natural antimicrobials from plants. In: (Ed.). **New methods of food preservation**: Springer, 1995. p.58-89. ISBN 1461358760.

NYINGI, D. et al. Genetic characterization of an unknown and endangered native population of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)(Cichlidae; Teleostei) in the Loboï Swamp (Kenya). **Aquaculture**, v. 297, n. 1, p. 57-63, 2009.

OLASUPO, N. et al. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Letters in applied microbiology**, v. 37, n. 6, p. 448-451, 2003.

ONARHEIM, A. Now a yeast extract to fortify fish. **Fish Farmer**, v. 15, n. 4, p. 45, 1992.

OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil—an essential oil from *Ocimum basilicum* L.—against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas*

by using different test methods. **Journal of Microbiological methods**, v. 54, n. 1, p. 105-110, 2003.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection®**, v. 69, n. 5, p. 1046-1055, 2006.

PARISH, C. The Relationship Between Humoral and Cell-Mediated Immunity. **Immunological Reviews**, v. 13, n. 1, p. 35-66, 1972.

PAVARAJ, M. et al. Development of immunity by extract of medicinal plant *Ocimum sanctum* on common carp *Cyprinus carpio* (L.). 2011.

PEDDIE, S.; ZOU, J.; SECOMBES, C. J. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 86, n. 1, p. 101-113, 2002.

PILLAY, T. V. R.; KUTTY, M. N. **Aquaculture: principles and practices**. Blackwell publishing, 2005. ISBN 1405105321.

PLANT, K. P.; LAPATRA, S. E. Advances in fish vaccine delivery. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1256-1262, 2011.

PRASAD, G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of some *Ocimum* species and clove oil. **Fitoterapia**, v. 57, p. 429-432, 1986.

QURESHI, A. A. et al. Inhibition of hepatic mevalonate biosynthesis by the monoterpene, d-limonene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1220-1224, 1988.

RAA, J. et al. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. **Diseases in Asian aquaculture**, v. 1, p. 39-50, 1992.

RAPHAEL, T.; KUTTAN*, G. Immunomodulatory activity of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene, and perillic acid. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 25, n. 2, p. 285-294, 2003.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 236-241, 2006.

REINITZ, G. Influence of diet and feeding rate on the performance and production cost of rainbow trout. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 112, n. 6, p. 830-833, 1983.

REQUE, V. R. et al. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquaculture**, v. 300, n. 1, p. 37-42, 2010.

RHODES, G. et al. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3883-3890, 2000.

RHODES, L. D. et al. Description and characterization of IS994, a putative IS3 family insertion sequence from the salmon pathogen, *Renibacterium salmoninarum*. **Gene**, v. 244, n. 1, p. 97-107, 2000.

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J. β -glucans as immunostimulants in fish. **Modulators of fish immune responses**, v. 1, p. 83-99, 1994.

ROMEO, D.; ZABUCCHI, G.; ROSSI, F. Reversible metabolic stimulation of polymorphonuclear leukocytes and macrophages by concanavalin A. **Nature: New biology**, v. 243, n. 125, p. 111, 1973.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1, p. 63-92, 1999.

SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. The activation of leucocytes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. **Diseases in Asian Aquaculture**, v. 11, p. 433-437, 1995.

SAURABH, S.; SAHOO, P. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

SBARRA, A. J.; KARNOVSKY, M. L. The biochemical basis of phagocytosis I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 6, p. 1355-1362, 1959.

SCERRA, V. et al. Influence of dairy *Penicillium* spp. on nutrient content of citrus fruit peel. **Animal feed science and technology**, v. 78, n. 1, p. 169-176, 1999.

SCHALL, T. J. et al. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 669-671, 1990.

SCHMIDT, A. S. et al. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5675-5682, 2001.

SECOMBES, C.; FLETCHER, T. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 53-71, 1992.

SECOMBES, C.; HARDIE, L.; DANIELS, G. Cytokines in fish: an update. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 6, n. 4, p. 291-304, 1996.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 114, n. 1, p. 15-24, 2006.

SHARMA, R. et al. Fish Proteins in Coronary Artery Disease Prevention Amino Acid–Fatty Acid Concept. In: WATSON, R. R. e PREEDY, V. R. (Ed.). **Bioactive Food as Dietary Interventions for Cardiovascular Disease**. USA: Elsevier, 2013. cap. 32, p.525–549. ISBN 978-0-12-396485-4.

SHEIKHZADEH, N. et al. Effects of *Zataria multiflora* and *Eucalyptus globulus* essential oils on haematological parameters and respiratory burst activity in *Cyprinus carpio*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 10, n. 2, p. 316-323, 2011.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.

SINYAKOV, M. S. et al. Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. **Vaccine**, v. 20, n. 31, p. 3668-3674, 2002.

SIWICKI, A. et al. In vitro influence of heat extract from firefly squid *Watasenia scintillans* on the phagocyte and lymphocyte activities in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Pathology (Japan)**, 1996.

SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 41, n. 1, p. 125-139, 1994.

SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. J. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 6, p. 1011-1022, 2001.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in applied microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

SMITH, D. C. et al. Qualitative analysis of citrus fruit extracts by GC/MS: an undergraduate experiment. **The Chemical Educator**, v. 6, n. 1, p. 28-31, 2001.

SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, n. 1, p. 71-90, 2003.

STAMMATI, A. et al. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. **Food and chemical toxicology**, v. 37, n. 8, p. 813-823, 1999.

STOSKOPF, M. Clinical pathology. **Fish medicine**, p. 113-131, 1993.

SUBBA, M.; SOUMITHRI, T.; RAO, R. S. Antimicrobial action of citrus oils. **Journal of Food Science**, v. 32, n. 2, p. 225-227, 1967.

SUN, J. D-Limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259, 2007.

SVOBODA, K.; GREENAWAY, R. Lemon scented plants. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 1, p. 23-32, 2003.

TACON, A. G.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. **Aquaculture**, v. 285, n. 1, p. 146-158, 2008.

TAKAOKA, O. et al. Effect of rotifer enrichment with herbal extracts on growth and resistance of red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel) larvae against *Vibrio anguillarum*. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 12, p. 1824-1829, 2011.

TANAKA, T. et al. Immunomodulatory action of citrus auraptene on macrophage functions and cytokine production of lymphocytes in female BALB/c mice. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 8, p. 1471-1476, 1999.

TASSOU, C. C.; NYCHAS, G. Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in

broth and in model food system. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 36, n. 3, p. 411-420, 1995.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from Franca, São Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 2, p. 189-196, 2008.

TSAI, B. Y. Effect of peels of lemon, orange, and grapefruit against *Meloidogyne incognita*. **Plant Pathol. Bull**, v. 17, p. 195-201, 2008.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Limnology**. CRC Press, 2012. ISBN 0203803957.

TUNG, M.; CHEN, S.; TSAI, S. General septicemia of streptococcal infection in cage-cultured Tilapia, *Tilapia mossambica*. **Southern Taiwan. COA Fish Dis Res**, v. 7, p. 95-105, 1985.

VAN HUNG, P.; CHI, P. T. L.; PHI, N. T. L. Comparison of antifungal activities of Vietnamese citrus essential oils. **Natural product research**, v. 27, n. 4-5, p. 506-508, 2013.

VERA-JIMENEZ, N. et al. Comparative study of β -glucan induced respiratory burst measured by nitroblue tetrazolium assay and real-time luminol-enhanced chemiluminescence assay in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 5, p. 1216-1222, 2013.

VERLHAC, V. et al. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, n. 6, p. 409-424, 1998.

WANG, W.-S.; WANG, D.-H. Enhancement of the resistance of tilapia and grass carp to experimental *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* infections by several polysaccharides. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 20, n. 3, p. 261-270, 1997.

WANNISSORN, B. et al. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 76, n. 2, p. 233-236, 2005.

WARDLE, C. New observations on the lymph system of the plaice *Pleuronectes platessa* and other teleosts. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 51, n. 04, p. 977-990, 1971.

WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B.; MCLEAY, D. J. Stress and acclimation. **Methods for fish biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland**, p. 451-489, 1990.

WOLFORD, R. W.; KESTERSON, J. W.; ATTAWAY, J. A. Physicochemical properties of citrus essential oils from Florida. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 1097-1105, 1971.

WU, Y.-R. et al. Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (*GIFT Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 1, p. 220-227, 2013.

WYNN, S. G.; FOUGERE, B. **Veterinary herbal medicine**. Elsevier Health Sciences, 2006. ISBN 032307037X.

YEH, R.-Y. et al. Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and

disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 27, n. 1, p. 26-32, 2009.

YILMAZ, S.; ERGÜN, S.; SOYTAŞ, N. Dietary supplementation of cumin (*Cuminum cyminum*) preventing streptococcal disease during first-feeding of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **J. Bio. Sci. Biotech**, v. 2, p. 117-124, 2013.

ZHENG, Z. et al. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, n. 3, p. 214-218, 2009.

ZHU, M.; LEW, K. T.; LEUNG, P. L. Protective effect of a plant formula on ethanol-induced gastric lesions in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 3, p. 276-280, 2002.