

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARCELO FELISBERTO DOS REIS

Avaliação do efeito do extrato pirolenhoso sobre parâmetros zootécnicos e na imunomodulação frente à infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Pirassununga

2022

MARCELO FELISBERTO DOS REIS

Avaliação do efeito do extrato pirolenhoso sobre parâmetros zootécnicos e na imunomodulação frente à infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Versão corrigida.

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz
Moro de Sousa

Pirassununga

2022

Ficha catalográfica

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação,
FZEA/USP, com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

Felisberto dos Reis, Marcelo

F315a Avaliação do efeito do extrato pirolenhoso sobre
parâmetros zootécnicos e na imunomodulação frente à
infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias /Marcelo
Felisberto dos Reis ; orientador Ricardo Luiz Moro de Sousa. -
- Pirassununga, 2022.

65 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos, Universidade de São Paulo.

MARCELO FELISBERTO DOS REIS

Avaliação do efeito do extrato pirolenhoso sobre parâmetros zootécnicos e na imunomodulação frente à infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Zootecnia

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Presidente da Banca Examinadora

Prof.(a). Dr.(a) _____

Instituição _____

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, minha família, minha esposa e meus amigos que sempre estiveram ao meu lado nos melhores e piores momentos, sendo essenciais para a construção do meu caráter e de minhas conquistas. Gratidão a todos vocês.

Dedico ao meu avô Clemente Felisberto dos Reis, que estará sempre junto de mim intercedendo no céu. Obrigado por tudo meu querido avô.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as dificuldades e conquistas que me ajudaram a crescer e me desenvolver profissionalmente, além das amizades que Ele me propôs durante essa caminhada no doutorado.

Agradeço aos meus pais Antonio e Patricia, que foram meu suporte e meu apoio, me ajudando com palavras de amor e afeto, muito obrigado meus queridos pais, amo vocês. Agradeço ao meu irmão Pedro Henrique, que me ajudou a cuidar dos peixes e pelas boas risadas e amizade que sempre tivemos.

Agradeço a minha esposa Mariana Zanata, que também me ajudou no manejo dos animais, e que sempre foi minha amiga e leal amada. Amo-te muito.

Agradeço ao pessoal da equipe do Laboratório de Higiene Zootécnica por toda a ajuda e suporte que me deram durante o doutorado, ficando agradecido pelo companheirismo e amizade do Nycolas, Talita, Natália, Waldelucy, Marisa, Silvia, aos estagiários e pessoas que passaram nessa caminhada de 4 anos. Meu muito obrigado de coração.

Ao Prof. Dr. Ricardo Moro, meu mais sincero obrigado pela parceria, pela ajuda e por sempre ser esse ser humano abençoado e cheio de fé que me ajudou nesse doutorado e que sempre será, além de um excelente profissional, uma pessoa de bom coração.

Agradeço a empresa AGTTEC pela parceria feita conosco e por me confiarem a realizar esse trabalho, fruto dessa parceria.

Também agradeço ao Instituto de Pesca, por me ensinarem e ajudarem sempre que possível.

Agradeço a CAPES pela concessão da Bolsa para o desenvolvimento do projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E a todos que de uma maneira direta ou indireta me ajudaram durante esses 4 anos, muito obrigado a todos vocês.

*“Não se apavore, nem se desamine, pois o Senhor, o seu Deus,
estará com você por onde você andar.”*

Josué 1:9.

“A humildade é o caminhar na verdade”

Santa Teresa D'Ávila

RESUMO

REIS, M. F. **Avaliação do efeito do extrato pirolenhoso sobre parâmetros zootécnicos e na imunomodulação frente à infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2022. 65 F. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

A piscicultura é um dos setores que mais tem crescido no mundo, com destaque para a criação de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Entretanto, bactérias do gênero *Streptococcus* estão associadas a eventos de alta mortalidade em tilapiculturas, com consequentes prejuízos ao produtor. Dessa forma, o presente estudo objetivou utilizar o extrato pirolenhoso (EP) de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) como aditivo alimentar, avaliando seu potencial efeito antimicrobiano, *in vitro*, através da detecção das concentrações inibitória e bactericida mínimas, e *in vivo*, através de teste de proteção ao desafio, bem como no crescimento e ganho de peso dos animais, verificando os perfis hematológico e fagocitário. O extrato foi incorporado na ração por meio de aspersão, em duas diferentes concentrações (0,5% e 1%), determinando a separação dos animais em três grupos: grupo controle, grupo EP 0,5% e grupo EP 1%, com três repetições por grupo. Após trinta dias, conforme as dietas de cada grupo, foram avaliados os parâmetros de ganhos de peso e crescimento. Para a avaliação hematológica, foram realizadas as contagens eritrocitária, leucocitária, trombocitária e diferencial de leucócitos, além da determinação da capacidade fagocítica. O desafio contra cepa patogênica de *S. agalactiae* foi monitorado por 14 dias pós-infecção. O EP apresentou atividade bactericida e bacteriostática com concentração de 12,5 v/v e 6,25 v/v, respectivamente. Não houve diferenças significativas com relação ao ganho de peso e comprimento dos animais entre os grupos ($P > 0,05$). Nas contagens eritrocitárias, houve diferença significativa quando comparadas as médias entre grupo controle e tratamento EP 1%, não se observando diferenças em relação às contagens de trombócitos e leucócitos totais. O número de linfócitos foi maior no grupo controle quando comparado ao grupo EP 1% ($P < 0,05$). Comparando as médias de neutrófilos, contudo, o grupo controle apresentou contagem menor em comparação aos grupos EP 0,5% e EP 1% ($P < 0,05$). Nas contagens de monócitos e eosinófilos, não houve diferenças significativas entre os três grupos. Em relação à capacidade fagocítica, houve diferença significativa entre o grupo EP 1% quando comparado aos grupos controle e EP 0,5%, enquanto o grupo EP 0,5% apresentou maior índice fagocítico ($P < 0,05$). No desafio, após 14 dias, houve uma baixa taxa de sobrevivência dos animais. Conclui-se

que o EP apresenta efeitos antimicrobianos e imunoestimulantes, porém não na proteção ao desafio contra *S. agalactiae*, nas concentrações utilizadas, indicando potencial utilização na piscicultura.

Palavras-chaves: *Streptococcus agalactiae*, extrato pirolenhoso, *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

REIS, M. F. **Evaluation of the effect of pyroligneous extract on zootechnical parameters and immunomodulation against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2022. 65 F. Doctoral Tesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Fish farming is one of the fastest growing sector in the world, with emphasis on the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production. However, bacteria of the genus *Streptococcus* are associated with high mortality events in tilapia farms, with consequent losses to producers. Thus, the present study aimed to use the pyroligneous extract (EP) of eucalyptus (*Eucalyptus* sp.) as a food additive, evaluating its potential antimicrobial effect, *in vitro*, through the detection of minimum inhibitory and bactericidal concentrations, and *in vivo*, through test of protection to the challenge, as well as in the growth and weight gain of fish, verifying the hematological and phagocytic profiles. The extract was incorporated into the feed by means of sprinkling, in two different concentrations (0.5% and 1%), determining the separation of the animals into three groups: control group, 0.5% EP group and 1% EP group, with three repetitions per group. After thirty days, according to the diets of each group, the parameters of weight gain and growth were evaluated. For hematological evaluation, erythrocyte, leukocyte, thrombocyte and leukocyte differential counts were performed, in addition to the determination of phagocytic capacity. The challenge against the pathogenic strain of *S. agalactiae* was monitored for 14 days post-infection. EP showed bactericidal and bacteriostatic activity with concentrations of 12.5 v/v and 6.25 v/v, respectively. There were no significant differences regarding the weight gain and length of the animals among the groups ($P > 0.05$). In the erythrocyte counts, there was a significant difference when comparing the means between the control group and the 1% EP treatment, with no differences in relation to thrombotic and total leukocyte counts. The number of lymphocytes was higher in the control group when compared to the 1% EP group ($P < 0.05$). Comparing the neutrophil means, however, the control group had a lower count compared to the EP 0.5% and EP 1% groups ($P < 0.05$). In monocyte and eosinophil counts, there were no significant differences among the three groups. Regarding the phagocytic capacity, there was a significant difference between the EP 1% group when compared to the control and EP 0.5% groups, while the EP 0.5% group had a higher phagocytic index ($P < 0.05$). In the challenge, after 14 days, there was a low survival rate of the animals. It is concluded that EP has antimicrobial and

immunostimulating effects, but not protection against *S. agalactiae* challenge, at the concentrations used, indicating potential use in fish farming.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, Pyroligneous Extract, *Oreochromis niloticus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução anual da produção de peixes cultivados no Brasil	22
Figura 2: Evolução da produção de peixes por região.....	23
Figura 3: Maiores espécies produzidas no mundo.....	24
Figura 4: Ovos fertilizados presentes na boca de fêmea de tilápia do Nilo.....	25
Figura 5: Galpão de estocagem de ração para peixes.....	27
Figura 6: Característica morfológica do gênero <i>Streptococcus</i> spp.	29
Figura 7: Infecção de <i>S.agalactiae</i> em tilápia do Nilo adulta.....	30
Figura 8: Representação de um sistema de produção de extrato pirolenhoso	35
Figura 9: Capacidade fagocítica e contagem dos macrófagos.....	42
Figura 10: Distribuição de aquários e infecção dos animais.	43
Figura 11: Concentração Inibitória Mínima (MIC) de <i>S. agalactiae</i> com a utilização de EP	45
Figura 12: Concentração Bactericida Mínima (MBC) de <i>S. agalactiae</i> com a utilização de EP.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Crescimento dos animais após 30 dias de alimentação.	46
Tabela 2: Comparações de peso e conversão alimentar	47
Tabela 3: Mortalidade e PRS de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) dez dias após o desafio com <i>S. agalactiae</i>	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Contagem total de hemácias: eritrócitos, trombócitos e leucócitos.	50
Gráfico 2: Contagem diferencial leucocitária dos grupos Controle, Neutrófilos, Monócitos e Eosinófilos.	52
Gráfico 3: Capacidade fagocítica (CP) e Índice fagocítico (IF) de <i>O. niloticus</i>	54
Gráfico 4: Mortalidade dos peixes catorze dias após o desafio com <i>S. agalactiae</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EP: Extrato Pirolenhoso

FAO: Organização das nações Unidas para Agricultura e Alimento.

LISTA DE SÍMBOLOS

Cm: centímetros

°C: Graus Celsius

g: Grama

xg: Gravidade

µm: Micrometro

nm: Nanômetro

Km: Quilometro

L: Litros

mL: Mililitros

µL: Microlitros

%: Porcentagem

UI: Unidades Internacionais

v/v: volume / volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Aquicultura mundial	20
2.2. Pisciculturas no mundo e no Brasil	21
2.3. Produção de peixes nativos no Brasil e tilápia do Nilo	23
2.4. Sanidade na piscicultura: manejo e a estreptococose em tilápias do Nilo.....	26
2.5. Utilização de antibióticos e vacinas na piscicultura	30
2.6. Utilização de probióticos, ervas medicinais e extratos naturais como aditivos em rações comerciais.....	32
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo Geral	37
3.2. Objetivos Específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. Comitê de ética	38
4.2. Peixes, condições experimentais e manejo.....	38
4.3. Teste <i>in vitro</i> do Extrato Pirolenhoso: determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e da Concentração Bactericida Mínima (MBC) para <i>Streptococcus agalactiae</i>	39
4.4. Preparo da ração com o extrato pirolenhoso	40
4.5. Parâmetros de crescimento	40
4.6. Análises hematológicas e coleta de soro	40
4.7. Atividade Fagocitária	42
4.8. Desafio com <i>Streptococcus agalactiae</i>	42
4.9. Análise dos resultados	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Teste <i>in vitro</i> – MIC e MBC.....	44
5.2. Parâmetros de crescimento e ganho de peso	46
5.3. Contagem Total: eritrócitos, leucócitos e trombócitos	48
5.4. Contagem diferencial das células sanguíneas.....	51
5.5. Capacidade Fagocítica e Índice Fagocítico	53
5.6. Desafio frente <i>S. agalactiae</i>	55
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade zootécnica que visa à produção de espécies animais em ambiente aquático, podendo-se destacar as criações de maior relevância: peixes, camarões, rãs, lagostas, moluscos como o polvo e lulas, além de jacarés e tartarugas, mostrando a grande diversidade de espécies encontrada nessa área (BRASIL, 2019).

Em termos de produção global, a aquicultura tem apresentado um crescimento expressivo quando comparado com outras áreas de produção animal, sendo que 50% dos pescados obtidos mundialmente já são utilizados para consumo humano e, segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2022), a produção global de peixes no ano de 2016 foi de 171 milhões de toneladas, estimando uma renda global de 362 bilhões de dólares.

O Brasil, apesar de não ter um consumo *per capita* elevado de alimentos provenientes da aquicultura, tem apresentado um enorme potencial para criação de organismos aquáticos, por ser um país continental com grande aporte hídrico e o único país da América Latina a projetar um crescimento de 104% na sua produção aquícola (FAO, 2021). Evidencia-se que, atualmente, o Brasil se tornou o 3º país que mais produz tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no mundo, apresentando um crescimento acentuado da produção dessa espécie, uma vez que as tilápias tiveram uma boa adaptação às condições climáticas e hídricas do país e por essas apresentarem características zootécnicas extremamente desejáveis (BRASIL, 2022). Nessas condições, torna-se cada vez mais necessário implementar melhorias no manejo dos animais, particularmente em termos de biossegurança, visando-se evitar a entrada e/ou circulação de microrganismos patogênicos nas unidades de produção.

Dentre esses patógenos, destaca-se o *Streptococcus agalactiae*, bactéria Gram positiva que se apresenta microscopicamente em arranjos de cocos em fileiras, e que está associada a enfermidades caracterizadas por exoftalmia, opacidade córnea, hemorragias internas dos órgãos e septicemia, provocando mortalidade em mais de 90% dos casos já registrados da doença, sendo a espécie *O. niloticus* a mais susceptível à manifestação da doença (CHEN et al., 2012). Apesar da existência de antibióticos utilizados para o controle desse patógeno, cada vez mais estudos indicam o aumento da resistência bacteriana a antimicrobianos, seja pela administração, dosagem ou período de tratamentos incorretos (SÁENZ et al., 2019). Visando melhorias no manejo sanitário, torna-se essencial o estudo de diferentes formas de prevenção da doença, incluindo

desenvolvimento e aplicação de vacinas, bem como de aditivos incorporados à ração. Em relação às vacinas, existem algumas vacinas comerciais existentes; entretanto, não se mostram como método completamente efetivo de prevenção por ocasionarem estresse ao plantel, facilitando infecções posteriores por microrganismos de caráter geralmente oportunista, como *Iridovirus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, entre outros (BRUM et al., 2016).

Com relação aos probióticos e extratos naturais, estes têm demonstrado grande eficiência com relação à proteção ao desafio e crescimento da tilápia do Nilo. Nesse sentido, Yin e colaboradores (2005), ao utilizarem duas ervas chinesas verificaram a estimulação positiva do sistema imune de tilápias, acompanhada da ativação de fagócitos. Também se destaca o trabalho de Brum e colaboradores (2016), utilizando os óleos de cravo da Índia e de gergelim, que apresentaram um melhor crescimento dos animais, sendo que animais alimentados com o óleo de gergelim apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100% quando desafiados pelo *S. agalactiae*. Contudo, para o extrato pirolenhoso, não há estudos indicando o uso como aditivo em ração para peixes; todavia, outros estudos têm demonstrado adequada resposta inibitória contra mastite bovina ocasionada por *Staphylococcus* spp. quando do uso desse extrato, além de resposta eficiente contra algumas espécies de fungos, como *Aspergillus* spp. (JUNIOR, TERRILE, AGUILAR, 2005; ALMEIDA et al., 2017). Dessa maneira, torna-se importante a avaliação de produtos a serem usados como aditivos sobre a resposta imune contra patógenos, além dos efeitos sobre os parâmetros zootécnicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aquicultura mundial

A aquicultura é uma das práticas comerciais mais antigas do mundo, sendo a China um dos primeiros países a investirem na área de pesca e criação de peixes, correspondendo a 90% do mercado de pesca (CAMARGO, POUEY; 2005). Atualmente, a atividade aquícola está presente em todos os continentes e é uma das áreas que mais cresce ao nível de produção mundial, ultrapassando algumas outras práticas de produção de alimentos como bovinocultura, suinocultura, avicultura, etc. (FAO, 2022), tendo um mercado consumidor ascendente, no qual se estima um crescimento mundial do setor de 62% e um aumento do mercado consumidor de 81% (KOBAYASHI et al., 2015). Essa vasta expansão se deve ao fato da aquicultura possuir diversas subáreas de produção como a piscicultura, ranicultura, algicultura, carnicicultura, entre outras (VALLADÃO, GALLANI, PILARSKI, 2018). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimento e Agricultura (2020), houve um crescimento expressivo nas produções de diversos organismos aquáticos quando comparados às pescas extrativistas. Esse crescimento está correlacionado a dois fatores como o alto crescimento populacional no mundo, necessitando-se cada vez mais de alimentos, e a preocupação por alimentos mais saudáveis, destacando-se a boa palatabilidade do alimento e as proteínas essenciais (FAO, 2018).

Quando se compara as produções por continentes, a região que tem o maior destaque é a Ásia, que atualmente domina o mercado aquícola com 89% da produção mundial, seguido pelo continente americano, com 5%, a Europa com 4%, a África com 2% e a Oceania, sem dados demonstrados. Quando se compara o nível de cada país, observa-se que os cinco primeiros países pertencem ao continente asiático, sendo a China um país com uma elevada produção, sendo 10 vezes maior que o segundo maior produtor, a Índia. Dos países europeus, destaca-se a Noruega, ocupando a 6ª posição, tornando-se consequentemente o maior produtor da Europa. Com relação ao continente americano, o Chile tem uma das maiores produções, ocupando a 8ª posição. Vale destacar que o Brasil tem tido um aumento expressivo em sua produção, estando em 13º maior país produtor, mostrando o potencial crescente, devido a sua vasta extensão

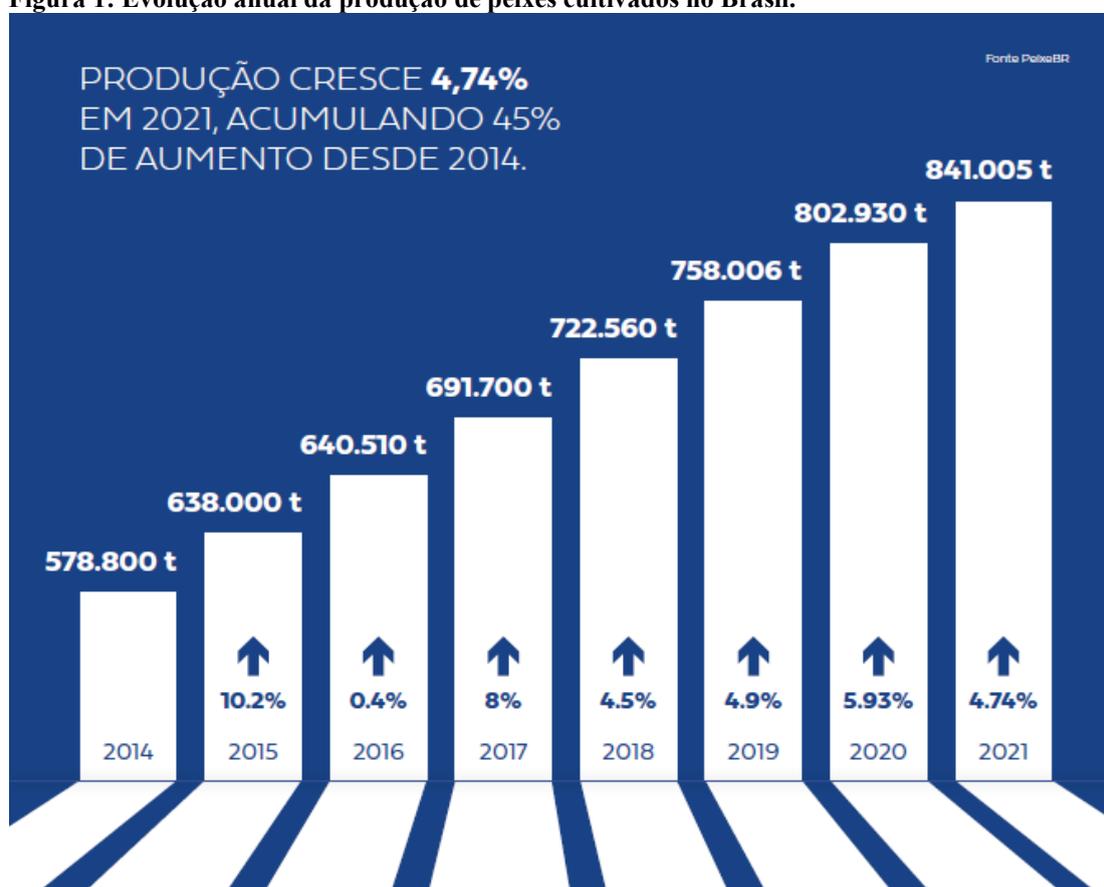
territorial e costa marítima, além de uma elevada quantidade de insumos para potencializar o crescimento aquícola no país (FAO, 2020).

2.2. Pisciculturas no mundo e no Brasil

Apesar de a aquicultura contemplar diversos organismos aquáticos para criação e comercialização, o setor que se destaca é a piscicultura, uma prática de produção aquícola que cada vez mais tem recebido importância no cenário mundial, no qual mais de 179 milhões de toneladas de pescado foram produzidos no ano de 2018, com a Ásia sendo o continente com maior produção no mundo (FAO, 2020). Referente à comercialização e produção, o setor é dividido em pesca extrativista, na qual os recursos pesqueiros são retirados do ambiente (BRASIL, 2012) e que tem apresentado uma expressiva queda nos últimos anos, apesar de ter um leve aumento na captura de animais marinhos em 2018 (FAO 2020); e a produção em cativeiro, que cada vez mais tem sido utilizada para criação de diversas espécies, sendo as três modalidades mais utilizadas: extensiva - os animais são criados em reservatórios e açudes prontos, tendo-se um baixo índice de produção, pois os animais somente alimentam-se de plâncton; semi-intensiva – os viveiros são escavados e a alimentação consiste em produção primária de plâncton e ração comercial, sendo a mais praticada atualmente; intensiva – os viveiros são projetados para armazenagem de animais de uma mesma espécie, a ração é balanceada e os mecanismos de abastecimento e escoamento hídricos são necessários para um bom processo produtivo (FRASCÁ-SCORVO, FILHO, 2011); e a super-intensiva – cultivos realizados em tanques-rede, podendo ser em tanques de alvenaria ou concreto, tendo um mecanismo de fluxo d'água contínuo, visando somente a criação de uma única espécie, com elevada povoação dessa espécie, entre 20 a 100 peixes por metro quadrado, necessitando-se de um maior cuidado na criação (LOPES, 2012). Destaca-se também os sistemas de circulação fechada como o sistema de aquaponia que consiste em utilizar uma produção integrada entre criação de peixe com o cultivo de plantas, podendo ser feita em sistemas de caixas, canaletas, entre outros, podendo ser focada para o consumo particular e/ou para vendas, uma vez que o consumo per/capita no mundo chegou a 20,5 kg/pessoa/ano em 2018 (BRASIL, 2016; FAO, 2020).

Com relação ao Brasil, o país tem tido um forte e constante crescimento com relação à piscicultura. Atualmente, ocupa a 13ª posição mundial em produção, e o setor desponta como uma alternativa viável para oferta de proteína animal pelo país apresentar um extenso território marinho, com aproximadamente 8.400 km de extensão, além de oferecer uma rica fonte de aquíferos e rios (FAO, 2020). Analisando o crescimento da piscicultura no país, houve um aumento de 45% entre o período de 2014 a 2021, e um crescimento de 4,74% no ano de 2021, tendo sido produzidas mais de 841.005 toneladas de espécies nativas e exóticas, demonstrando uma crescente evolução nesse setor (Figura 1) (PEIXE BR, 2022).

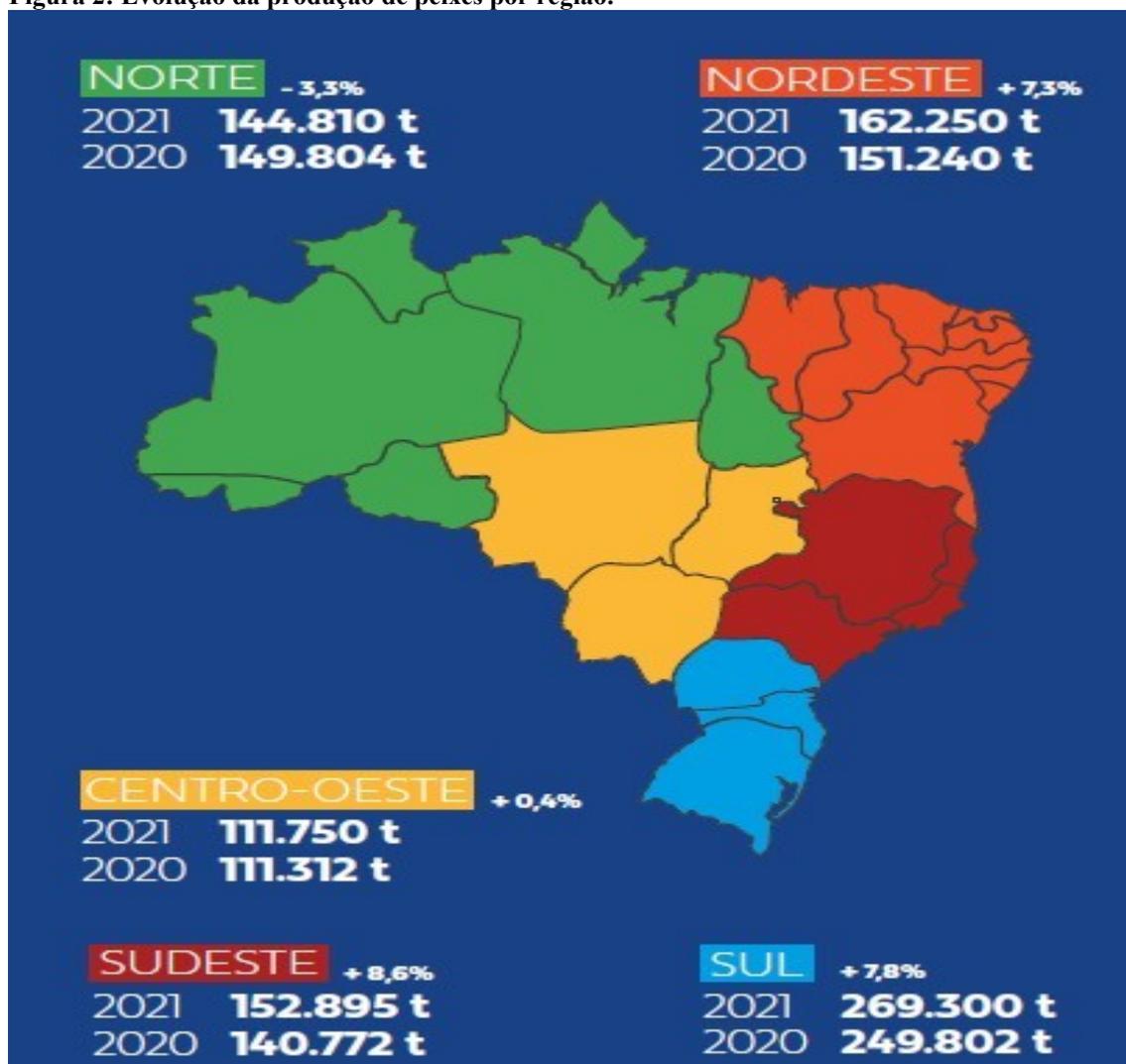
Figura 1: Evolução anual da produção de peixes cultivados no Brasil.



Quanto à produção de peixes por regiões, a região Sul tem tido um papel importante no crescimento da piscicultura no país, com 182 mil toneladas produzidas, tendo-se como destaque o estado do Paraná como o maior produtor tanto em nível regional como em nível nacional, com 112 mil toneladas produzidas somente no estado, seguidos pelas regiões Norte, com produção de 164 mil toneladas, Centro-Oeste, com

122 mil toneladas, Sudeste, com 115.300 toneladas e Nordeste, com 111 mil toneladas produzidas (Figura) (PEIXE BR, 2022).

Figura 2: Evolução da produção de peixes por região.



Fonte: PEIXE BR, 2022.

2.3. Produção de peixes nativos no Brasil e tilápia do Nilo

Apesar de uma queda na produção nativa, o Brasil apresenta uma grande gama de ictiofauna e, por conter bacias hidrográficas com características próprias, envolvendo diferentes espécies de peixes, a produção também pode ter características regionais; entre as espécies nativas, destacam-se: tambaqui (*Colossoma macroporum*), pirapitinga (*Piaractus brachipomus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pirarucu (*Arapaima gigas*) e tucunaré (*Cichla ocellaris*), entre outros, e alguns híbridos como a tambatinga (MUÑOZ et al., 2015; SERNA, 2018). Com relação às espécies exóticas, tem havido

um crescimento elevado em decorrência da boa adaptação dessas espécies ao clima e às condições de criação, destacando-se nesse cenário o pangásius (*Pangasianodon hypophthalmus*), que superou a produção de salmão (*Salmonidae*) no mundo (PEIXE BR, 2022), e principalmente a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) que têm se tornado a espécie mais importante em termos de produção nacional e mundial. Em nível mundial, segundo a FAO (2021), a tilápia foi à terceira espécie de peixe mais produzida do mundo (Figura 3), mostrando uma grande aceitação da população e dos criadores, refletindo também na produção nacional, no qual abrange mais de 50% do mercado produtor, sendo a espécie mais produzida em todos os estados e elevando o país à posição de 3º maior produtor de tilápia do mundo, com um volume de 534 mil toneladas, ficando à frente de grandes produtores mundiais como as Filipinas e a Tailândia (PEIXE BR, 2022).

Figura 3: Maiores espécies produzidas no mundo

	2010	2012	2014	2016	2018	2018 share
	(thousand tonnes)					(percentage)
Finfish						
Grass carp, <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	4 213.1	4 590.9	5 039.8	5 444.5	5 704.0	10.5
Silver carp, <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	3 972.0	3 863.8	4 575.4	4 717.0	4 788.5	8.8
Nile tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i>	2 657.7	3 342.2	3 758.4	4 165.0	4 525.4	8.3
Common carp, <i>Cyprinus carpio</i>	3 331.0	3 493.9	3 866.3	4 054.7	4 189.5	7.7
Bighead carp, <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	2 496.9	2 646.4	2 957.6	3 161.5	3 143.7	5.8
Catla, <i>Catla catla</i>	2 526.4	2 260.6	2 269.4	2 509.4	3 041.3	5.6
<i>Carassius</i> spp.	2 137.8	2 232.6	2 511.9	2 726.7	2 772.3	5.1
Freshwater fishes nei, ¹ Osteichthyes	1 355.9	1 857.4	1 983.5	2 582.0	2 545.1	4.7
Atlantic salmon, <i>Salmo salar</i>	1 437.1	2 074.4	2 348.1	2 247.3	2 435.9	4.5
Striped catfish, <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	1 749.4	1 985.4	2 036.8	2 191.7	2 359.5	4.3
Roho labeo, <i>Labeo rohita</i>	1 133.2	1 566.0	1 670.2	1 842.7	2 016.8	3.7
Milkfish, <i>Chanos chanos</i>	808.6	943.3	1 041.4	1 194.8	1 327.2	2.4
Torpedo-shaped catfishes nei, <i>Clarias</i> spp.	343.3	540.8	867.0	961.7	1 245.3	2.3
Tilapias nei, <i>Oreochromis</i> (=Tilapia) spp.	472.5	693.4	960.8	972.6	1 030.0	1.9
Rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	752.4	882.1	794.9	832.1	848.1	1.6
Wuchang bream, <i>Megalobrama amblycephala</i>	629.2	642.8	710.3	858.4	783.5	1.4

Fonte: FAO, 2021.

A tilápia do Nilo é uma dos ciclídeos mais produzidos no mundo, embora existam outras 22 espécies que são comercializadas, destacando-se a tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), tilápia Azul (*Oreochromis aureus*), *Tilapia zilli* e *Tilapia rendalli*, com elevadas produções em países subtropicais e tropicais (GODOY, 2018), e também alguns híbridos como a Tilápia híbrida vermelha (*Oreochromis* spp.) que tem tido um grande destaque nas criações da Malásia (MOHAMAD et al., 2021).

O grupo das tilápias (subfamília *Pseudocrenilabrinae*) é dividido em três gêneros diferentes, diferenciados pelos hábitos dos reprodutores em relação à fase embrionária: *Sarotherodon*, no qual o macho e a fêmea cuidam e incubam os ovos na boca; *Oreochromis*, no qual somente a fêmea incuba o ovo na boca, e o gênero *Tilapia*, no qual a desova é realizada em algum tipo de substrato (YASUI et al., 2006). A tilápia é um peixe teleósteo e prefere ambiente de água doce com profundidade rasa, com uma temperatura para um bom desenvolvimento em torno dos 29° a 31°C, apresentando uma melhor resposta de crescimento nesta faixa de temperatura, quando comparada à temperatura de 22°C, sendo ainda onívora, alimentando-se de fitoplâncton, pequenos vertebrados, detritos, algumas espécies de rãs e até de pequenos peixes (IGARASHI, 2008).

Com relação ao ciclo reprodutivo e maturação sexual, a espécie *O. niloticus* apresenta uma maturação sexual muito rápida e múltiplas desovas durante o ano, apresentando um período vitelogênico mais curto em comparação com outros peixes, sendo que os alevinos atingem a maturidade sexual por volta dos 6 meses. Após a fecundação dos gametas, a fêmea recolhe os ovos fertilizados, e os mantém na boca até a fase de eclosão, quando a fêmea deposita-os em corpos d'água, com a consequente eclosão, normalmente em temperaturas entre 24-27°C (Figura 4) (MOREIRA, 2001; IZQUIERDO et al., 2001; ORLANDO et al., 2017).

Figura 4: Ovos fertilizados presentes na boca de fêmea de tilápia do Nilo.



Fonte: s3piscicultura.com.br, 2022.

Além da fácil reprodução, apresenta parâmetros zootécnicos altamente desejáveis onde se destacam: um rápido crescimento, tendo um tempo de criação para o abate de 6 meses, possibilidade de sobreviver em alta densidade de estocagem, alimentação onívora, boa resistência às condições ambientais e ao manejo diário, carne de boa palatabilidade e aceitação pelo consumidor, com facilidade para filetagem. Em particular, *O. niloticus* apresenta melhores criação e adaptação em cativeiro quando comparado à outras espécies, corroborando sua importância na piscicultura mundial (ZANOLO, YAMURA, 2006; KUBITZA, 1999; FERNANDES, 2014; LEIRA et al., 2017; MOHAMAD et al., 2021).

Com as características inerentes à espécie, e pelo país possuir uma vasta área para atividade piscícola, o Brasil tem investido cada vez mais na criação de tilápias do Nilo, tornando-se necessário o investimento contínuo em nutrição de qualidade, sendo que foram produzidas nacionalmente mais de 747 mil toneladas de ração na aquicultura, destacando as formulações para peixes e camarões (DAS CHAGAS CARDOSO FILHO et al., 2011; SINDIRAÇÕES, 2017).

2.4. Sanidade na piscicultura: manejo e a estreptococose em tilápias do Nilo

Em vista da crescente produção de tilápias no país, investigações e tecnologias para minimizarem ou evitarem problemas sanitários que invariavelmente acarretam perdas econômicas para o piscicultor são cruciais. Dessa forma, o adequado manejo e o planejamento da biosseguridade na unidade de produção concorrem para a obtenção de plantéis de boa qualidade (LOPES, 2012).

Alguns cuidados incluem o tratamento adequado da água, uma vez que, se os níveis dessa não estiverem dentro dos parâmetros (pH, nível de amônia, condutividade, etc.), pode haver redução na qualidade, com prejuízos à produção, incluindo mortalidade no plantel (BACCARI, 2002). Outros pontos importantes para a prevenção e cuidados dos animais são: evitar o acúmulo de matéria orgânica, realizar a desinfecção dos equipamentos utilizados na produção antes e após o manuseio como redes, bombas de oxigenação, aquecedores, entre outros materiais, formulação correta das rações e armazenagem das mesmas em galpões arejados, evitando-se umidade e conseqüente proliferação de fungos, com afastamento em relação a paredes e pisos no intuito de se controlar a presença de roedores (Figura 5) (KUBITZA, 2009; LOPES, 2012).

Mesmo com a adoção de cuidados e práticas adequadas de manejo, os peixes estão propensos a infecções que podem ser divididas em duas categorias: as doenças infecciosas, em cuja etiologia estão parasitas, bactérias, fungos ou vírus como agentes primários ou ainda secundários da enfermidade, podendo estar associadas a episódios de estresse ou imunossupressão; e as doenças não infecciosas, que podem incluir como agentes fatores ambientais (aumento da temperatura d'água, exposição direta ao sol, modificações bruscas no pH, aumento do nitrito, nitrato e amônia na água, etc.), além de fatores nutricionais (erros na formulação de rações e/ou presença de micotoxinas em decorrência da armazenagem inadequada) (LOPES, 2012; GODOY, 2018).

Figura 5: Galpão de estocagem de ração para peixes.



Fonte: www.snatural.com.br, 2018.

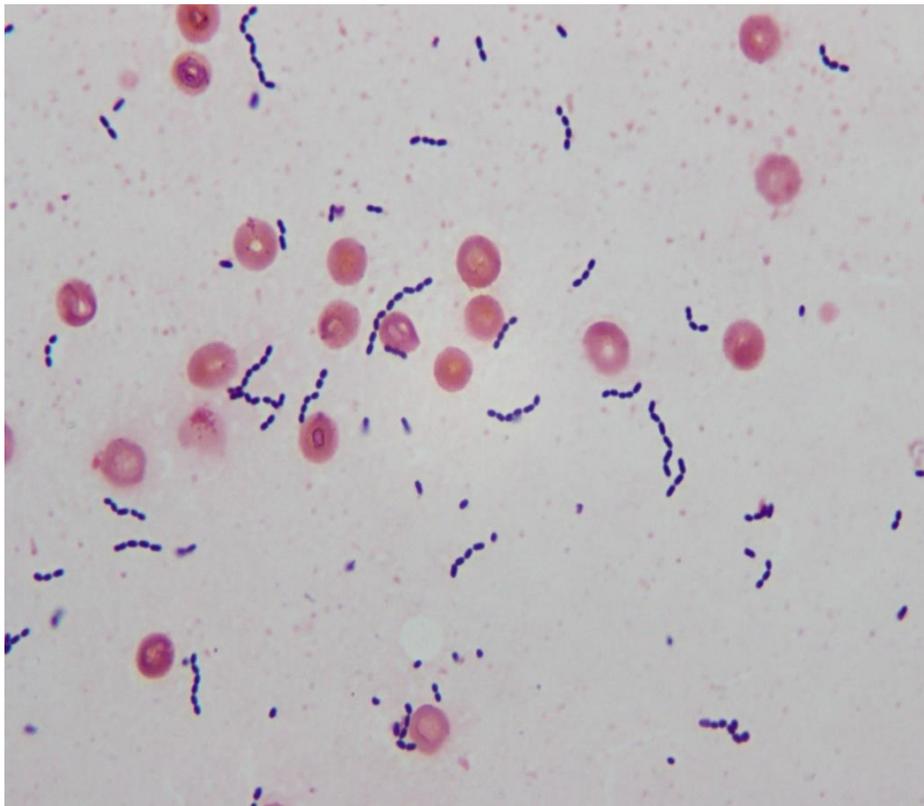
Ainda que a tilápia do Nilo seja uma espécie que apresente uma resistência relativamente maior aos desafios infecciosos, em comparação com outras espécies de peixes, qualquer fator estressante pode desencadear um desequilíbrio imunológico, a exemplo do elevado número de animais por área, característico dos sistemas intensivos ou super-intensivos, que geram condições propícias para o desenvolvimento de enfermidades por patógenos oportunistas, como os vírus da família *Iridovirus* e *Orthomyxoviridae*, parasitas como *Ichthyophthirius multifiliis* e *Chilodonella* sp., e, principalmente, agentes bacterianos, como algumas espécies de *Aeromonas* móveis e, com maior destaque, bactérias do gênero *Streptococcus*, atualmente o gênero bacteriano que mais se tem associado à mortalidade em plantéis (MUNANG'ANDU, MUTOLOKI, EVENSEN, 2016; SU et al., 2016).

Streptococcus spp. constituem um gênero de bactérias Gram positivas, que microscopicamente apresentam-se como cocos agrupados em linhas ou fileiras, medindo aproximadamente 0,6 a 1µm, não possuindo flagelos para locomoção e sendo anaeróbias facultativas (Figura 6), presentes na microbiota da boca, pele e intestino de seres humanos e animais. No entanto, estão associadas com quadros infecciosos em situações de imunodeficiência, sendo que em bovinos ocasionam mastite e, em suínos, podem acarretar artrites, meningoencefalites e endocardites, podendo levar o animal a óbito (GOMES, 2013).

Com relação às pisciculturas, a estreptococose é uma doença que ocasiona septicemia tanto em peixes de água doce como em peixes de água salgada. As tilápias do Nilo são afetadas principalmente por duas espécies desse gênero, *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae*, com destaque para *S. agalactiae*, que apresenta mais de 10 sorotipos diferentes (I ao IX, sendo o sorotipo I separado em Ia e Ib), e está associada a maiores índices de mortalidade em pisciculturas, em torno de 95%, sendo os quadros infecciosos pela bactéria mais prevalentes em estações quentes (primavera e verão), quando a temperatura da água pode chegar acima dos 28°C, configurando-se como uma das doenças emergentes mais preocupantes no setor aquícola (EVANS et al., 2009; BRUM et al., 2016). No Brasil, há prevalência dos grupos Ib nas regiões Sudeste e Sul, sendo detectados nos estados de São Paulo e Paraná, e presença de sorotipo III no Nordeste, sendo esse sorotipo também presente em um surto que ocasionou meningite em humanos na Ásia (CHIDEROLI et al., 2017; LEAL, FIGUEIREDO, TAVARES, 2019; VERRI, 2022).

Em relação à transmissão da doença, ocorre de forma horizontal, podendo ser pelo contato entre os peixes infectados (via oral/fecal ou mordidas de animais sadios com os infectados), alimento contaminado e/ou materiais não esterilizados corretamente que podem conter a bactéria e, assim, disseminar a doença na água. Dessa forma, de um modo geral, em ambiente com uma superpopulação de animais, o risco de ocorrer uma proliferação é grande, o que irá gerar alta mortalidade na criação. Destaca-se também que a fase adulta dos peixes apresenta uma maior resistência para a doença; contudo, a fase juvenil é a mais acometida pela doença por não apresentar uma imunidade tão desenvolvida (AMAL & ZAMRI-SAAD, 2011; SKOV et al., 2018; KE et al., 2021).

Figura 6: Característica morfológica do gênero *Streptococcus* spp.



Fonte: <https://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1171>. Acesso em: 18 de outubro de 2022.

A via de entrada do *Streptococcus* spp. é o epitélio gastrointestinal, onde o patógeno se desenvolve num primeiro momento e, então, começa a migrar para os órgãos alvos dos animais, que são o baço, olhos e encéfalo, apresentando como fatores de virulência: proteínas de aderência a superfícies epiteliais e citocinas necróticas, utilizando a via hematogênica para se proliferar no organismo do hospedeiro (IREGUI et al, 2015).

Os sinais clínicos observados são: anorexia, exoftalmia, opacidade da córnea, natação errática, além de necrose de brânquias e pancardite – inflamação do pericárdio, miocárdio e nas válvulas cardíacas – presente nas infecções pelo sorotipo Ib, gerando alta mortalidade no plantel (Figura 7) (CHEN et al., 2012, BRUM et al., 2016).

Figura 7: Infecção de *S. agalactiae* em tilápia do Nilo adulta.



Fonte: Copagril, 2020.

2.5. Utilização de antibióticos e vacinas na piscicultura

Para o controle da estreptococose nas tilapiculturas e de outras bacterioses, cada vez mais utilizam-se antimicrobianos e, como medida de prevenção, as vacinas comerciais têm ganhado espaço (MUNANG'ANDU, PAUL, EVENSEN, 2016).

Os antimicrobianos foram uma das maiores descobertas mundiais e desde a descoberta da penicilina em 1928, mais de 100 compostos antibióticos foram identificados e produzidos, notadamente na década de 1970. Atualmente, são utilizados como agentes terapêuticos, tanto na medicina humana como veterinária, sendo empregados preventivamente na produção animal como aditivos para crescimento, com ampla diversidade entre as espécies de interesse zootécnico. Na aquicultura e agricultura são utilizados, no total, 51 antimicrobianos com restrições entre diferentes países, podendo-se destacar a oxitetraciclina e o florfenicol, antimicrobianos de uso veterinário e que são os mais utilizados comercialmente em pisciculturas (DAVIES, 2006; DONE, VENKATESAN, HALDEN, 2015).

Em contraposição ao uso de antimicrobianos, os microrganismos, principalmente as bactérias, são selecionados de maneira cada vez mais intensa para resistência a esses compostos e, segundo O'Neil (2016), até 2050, correrão mais de 10 milhões de óbitos no mundo, em decorrência de infecções por bactérias multirresistentes em populações humanas, acarretando mais de 100 trilhões de dólares de despesas. Esse quadro reflete também nas pisciculturas. Por exemplo, o florfenicol é um antibiótico de amplo espectro, atingindo tanto bactérias Gram positivas como Gram negativas, uma

vez que o fármaco inibe a síntese proteica; contudo, a dosagem utilizada em casos de surtos por *S. agalactiae* em tilapiculturas não tem sido eficiente, necessitando-se utilizar uma quantidade maior do fármaco para ter eficiência em sua utilização (OLIVEIRA et al., 2018). Além disso, em trabalho realizado por Sáenz e colaboradores (2019), a utilização desse antibiótico por via oral em peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus* tem aumentado a seleção de bactérias patogênicas carreando genes de resistência aos antimicrobianos, assim como de bactérias comensais intestinais, agravando-se o quadro pela fácil dispersão dessas cepas na água, além de gerar um aumento exponencial de genes de resistência aos antibióticos, indicando uma resistência a antibióticos de amplo espectro. Nesse cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019) realizou uma lista de antibióticos separada em três conjuntos de utilização: “criticamente importante”; “altamente importante” e “importante”, como uma maneira de diminuir o uso descontrolado desses na aquicultura.

Com relação às vacinas comerciais, o pioneirismo das primeiras vacinas a serem desenvolvidas e testadas na aquicultura ocorreu nos Estados Unidos, com a injeção de bactérias mortas de *Aeromonas punctata* em carpas, resultando, em um primeiro momento, numa alternativa preventiva adequada. Subsequentemente ao desenvolvimento das primeiras vacinas, diversas formulações foram surgindo com o passar dos anos com a utilização de tecnologias mais avançadas, desde vacinas com agentes atenuados, vacinas inativadas, vacinas com DNA recombinante e baseadas em vetores heterólogos (SNIESZKO et al, 1938; GUDDING & VAN MUISWINKEL, 2013; DADAR et al., 2017).

De um modo geral, as vacinas podem ser aplicadas de quatro formas: intraperitonealmente, em que a injeção é aplicada na região peritoneal do animal, sendo essa uma das formas mais utilizadas atualmente; intramuscular, aplicando-se a dose da vacina no músculo do animal, podendo-se citar como exemplo as vacinas de DNA contra alguns tipos de vírus; a de imersão, que é colocada uma parte da vacina na água; e a vacinas orais, colocadas em pellets ou misturadas na própria ração, podendo ser aplicadas diretamente na boca do peixe (DADAR et al., 2017; APTA, 2021).

Apesar de vários métodos e vias diferenciais de aplicação, testes com imunização oral, imersão e sprays têm apresentado resultados variados, podendo apresentar eficácia ou não do protocolo vacinal. Contudo, as dificuldades no uso de vias de imunização alternativas e a melhor compreensão do mecanismo de proteção tem estimulado o desenvolvimento de vacinas mais eficientes (MUNANG'ANDU, PAUL, EVENSEN,

2016). Ademais, vacinas comerciais eficientes contra *S. agalactiae* já são comercializadas; contudo, vacinação em juvenis de tilápias ainda são restritas, mostrando uma melhor imunização quando os animais estão em fase de alevinos, ainda não tendo atingido um grama de peso; ademais, o estresse ocasionado pela retirada do animal de seu habitat para a aplicação intraperitoneal/intramuscular pode acarretar uma maior susceptibilidade do peixe a patógenos oportunistas como *Iridovirus*, *Nocardia*, *Trichodina*, entre outros (ABSALI, MOHAMAD, 2012; BRUM et al., 2016; KE et al., 2021).

2.6. Utilização de probióticos, ervas medicinais e extratos naturais como aditivos em rações comerciais

No contexto das limitações para ampla utilização de vacinas, conforme mencionado, e a crescente preocupação com o uso excessivo de antimicrobianos devido à seleção de bactérias multirresistentes, métodos alternativos para potencializar o crescimento, bem como a resposta imune de peixes frente aos desafios, têm sido cada vez mais estudados.

Nesse sentido, os probióticos, alguns tipos de ervas medicinais e óleos essenciais têm mostrado um grande potencial na aquicultura para a prevenção de doenças, otimização da absorção de nutrientes pelos animais e melhora na qualidade da água (MUNIR et al., 2016; SRISAPOOME, AREECHON, 2017). Algumas ervas e extratos vêm sendo utilizados na medicina humana a centenas de anos, inclusive como imunomoduladores, além de já terem sido utilizados em dietas de algumas espécies animais (YIN et al., 2005).

As ervas medicinais apresentam componentes que têm uma resposta eficiente para alguns tipos de patógenos encontrados em pisciculturas, sendo os principais: polifenóis, saponinas, flavonoides, alcaloides, entre outros (ZHANG et al., 2022) e, em estudos realizados por Yin e colaboradores (2005), duas ervas chinesas – *Scutellaria radix* e *Astragalus radix* – foram utilizadas para avaliar a resposta imune não específica na alimentação de tilápias e os resultados mostraram que, após uma semana de alimentação contendo essas ervas, houve um aumento na atividade de lisozima e, após três semanas, houve um maior estímulo para resposta fagocitária dos leucócitos.

Com relação aos probióticos, apresentam como característica o uso de microrganismos vivos – benéficos para a saúde animal – que irão ajudar na

recomposição da microbiota intestinal, sendo o *Bacillus* sp. a espécie mais utilizada por apresentar uma melhor capacidade de produzir substância antimicrobianas; contudo, existem diversos microrganismos que também apresentam características para serem classificados como probióticos por melhorarem a imunidade e também a estrutura e diversificação da microbiota bacteriana, além de apresentarem diversos benefícios para os animais como melhora do crescimento, fornecimento de nutrientes, melhora na qualidade de água, maior área de absorção do sistema digestivo, dentre outros benefícios que tem demonstrado em diversos estudos (KUEBURTORNYNE, ABARIKE & LU, 2019). Em tempo, Srisapoom e Areechon (2016), após alimentarem tilápias do Nilo com *Bacillus pumilus* adicionado à ração e realizarem desafio com *S. agalactiae* em condições laboratoriais, verificaram um aumento da resposta imune dos espécimes e, quando analisada a atividade fagocitária e os níveis de ânions superóxidos, foi detectado também um aumento desses níveis, indicando o efeito positivo do probiótico na nutrição e imunomodulação dos animais.

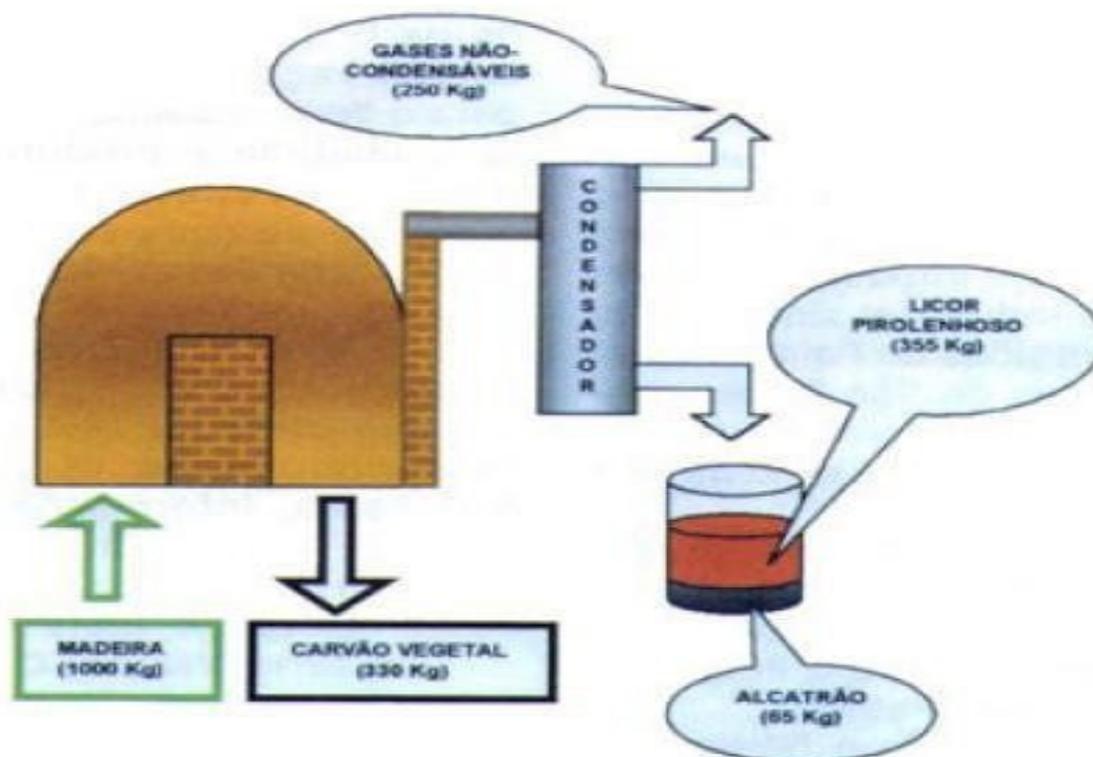
Outras fontes alternativas de aditivos são os extratos e óleos compostos de plantas. Os óleos essenciais são derivados de plantas apresentam ampla utilização na aquicultura, desde o uso como anestésicos até como antimicrobianos, e seus efeitos apresentam uma redução nas alterações bioquímicas e endócrinas, colaborando com o desempenho e melhora do bem-estar animal (SOUZA et al., 2019). Alguns óleos essenciais também se tornam alternativa profilática contra *S. agalactiae*, com efeitos benéficos sobre o crescimento e na resposta imune dos animais, conforme indicado por Brum e colaboradores (2016), ao avaliarem o efeito do óleo de gengibre e óleo de cravo da Índia em dietas para tilápias do Nilo desafiadas com *S. agalactiae*; os óleos conferiram melhoras nos parâmetros zootécnicos da tilápia e no desafio realizado, sendo que o grupo que recebeu 0,5% do óleo de gengibre apresentou uma taxa de 100% de sobrevivência do plantel ao desafio quando comparado com o grupo controle.

Outros extratos utilizados na indústria alimentícia têm mostrado efeitos antibacterianos e antimicóticos eficientes, como é o caso do extrato pirolenhoso (EP).

Há relatos da utilização do EP há milênios, mas foi no século XX, após a segunda guerra mundial que o Japão começou a utilizar, na agricultura, como um defensivo agrícola, uma vez que esse consegue repelir alguns tipos de pragas e doenças que afetam as produções de folhagens, atuando positivamente também no condicionamento do solo (ARAÚJO, 2018; MOREIRA et al., 2019). Também é conhecido como “fumaça líquida” por ser usado na defumação de carnes, conferindo

aroma e cor ao produto. Em seu processo, o extrato é produzido pela queima de um determinado vegetal como o eucalipto, o bambu, ou algum outro espécime vegetal de interesse. A pirólise ocorre em uma temperatura acima dos 80°C, para evitar acúmulo de água e diluir o extrato, evitando-se temperaturas superiores a 150°C para não se obter uma quantidade elevada de alcatrão, tornando o extrato inviável para utilização na agropecuária (Figura 8). Após essa queima, em condições desejáveis, o extrato acaba sendo separado em três partes distintas. A primeira parte compreende o óleo vegetal (em torno de 10%); na segunda parte, encontra-se o extrato propriamente dito (em torno de 65-75% do volume total), e na última parte encontra-se o alcatrão, que corresponde a 30% do volume total. Havendo resíduos de alcatrão no extrato, após seu procedimento, o extrato acaba por se tornar um produto inviável, pois as impurezas do alcatrão acabam ocasionando efeitos adversos no produto. Realizada a fase de pirólise, ocorre uma destilação do líquido condensado, sendo a temperatura dessa destilação de aproximadamente 115°C e é necessário o descarte dos primeiros 10% do material, no início e no final do procedimento, para se obter um produto isento de resíduos e com mais pureza, podendo ser realizado uma dupla destilação para se ter um produto mais puro e livre de qualquer resíduo. Vale ressaltar que apesar de ser um processo simples, é necessário todo cuidado para sua realização porque um erro pode concorrer para a perda de todo material (BORUSK, 2009; ARAÚJO, 2018).

Figura 8: Representação de um sistema de produção de extrato pirolenhoso.



Fonte: < www.sitiodamata.com.br>. Acesso em: 26 de agosto de 2019

Com relação a sua composição química, o EP de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) apresenta mais 200 compostos orgânicos; entre eles, uma grande quantidade de fenóis, metilfenóis entre outros, além de apresentar uma grande quantidade de compostos químicos presentes, que vão desde etanóis, metano, ciclohexano, ácidos butanóicos, ácidos butenóicos, ácidos pentenóico, maltol, entre outros (AGTTEC, 2011). Dessa forma, o extrato apresenta uma fonte de compostos químicos que estão presentes em alguns antimicrobianos utilizados comercialmente.

Ensaio quanto à eficiência e eficácia de EP frente a bactérias têm tido um grande avanço em diversas áreas. Souza e colaboradores (2021) utilizaram o EP de *Eucalyptus grandis* para testar a eficiência contra biofilmes dentários e utilizá-lo em microrganismos encontrados na mucosa oral como *Candida albicans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus mutans*; os resultados demonstraram uma efetiva resposta do extrato contra esses microrganismos, além de ajudar na recomposição mineral e no controle de cáries dentárias.

Outro exemplo do EP é como um potencial antifúngico. A extração de mamona mostrou uma significativa ação, em testes *in vitro*, contra cepas de espécies de

Cryptococcus, mostrando que uma pequena quantidade desse extrato foi suficiente para a inibição do desenvolvimento desses fungos, indicando seu potencial uso frente a microrganismos de importância médica e veterinária (SILVA et al, 2021). Vale citar também que em estudo realizado por Almeida e colaboradores (2019), o EP de *E. saligna*, testado para se avaliar as características sanitizantes do produto contra o *Aspergillus niger*, fungo presente em rações com armazenagem incorreta, demonstrou uma resposta efetiva contra essa espécie de fungo.

Na área veterinária, de um modo geral, há trabalhos indicando a eficiência do EP em determinadas criações. Em granjas de aves, há ensaios mostrando utilização do EP em camas de frango para evitar a proliferação de alguns parasitas e até mesmo de bactérias patogênicas como a *Salmonella* spp. (SOLCAN et al., 2010). Há também estudos caracterizando o uso de EP em casos de mastites bovinas ocasionadas por *Staphylococcus aureus* e demais *Staphylococcus* spp., sendo que o EP provoca um maior halo de inibição ao crescimento dessas bactérias, em ensaios de disco-difusão em ágar, quando comparado com a Gentamicina, antibiótico de amplo espectro utilizado tanto na veterinária como na área de saúde humana (JUNIOR, TERRILE, AGUIAR, 2010).

Dessa forma, alinhando as exigências da OMS para a diminuição da utilização de antimicrobianos e a iniciativa de se bioprospectar produtos naturais que possam ajudar na estimulação da imunidade, além do crescimento e ganho de peso do animal, o extrato pirolenhoso mostra-se como potencial aditivo em dietas para animais de produção.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o extrato pirolenhoso do eucalipto (*Eucalyptus* sp.) como um aditivo para o crescimento e sobrevivência, através de parâmetros hematológicos, em peixes da espécie *O. niloticus* (Tilápia do Nilo), submetidos ao desafio com *Streptococcus agalactiae*.

3.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar os efeitos bacteriostático e bactericida *in vitro* do extrato pirolenhoso frente à *Streptococcus agalactiae*;

2. Avaliar indicadores zootécnicos em tilápias alimentadas com ração contendo extrato pirolenhoso;

3. Avaliar o perfil hematológico de tilápias alimentadas com ração contendo extrato pirolenhoso;

4. Avaliar possíveis efeitos imunoestimulatórios e proteção ao desafio com *Streptococcus agalactiae* em tilápias alimentadas com ração contendo extrato pirolenhoso.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Comitê de Ética

O ensaio foi realizado seguindo os princípios éticos na experimentação animal e autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, FZEA-USP), protocolo nº 9321250521.

4.2. Peixes, condições experimentais e manejo

Os procedimentos foram realizados na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos- USP (FZEA – USP), Campus Fernando Costa, de acordo com a metodologia proposta por Brum e colaboradores (2016) com algumas adaptações.

Foram utilizados 500 peixes da espécie *O. niloticus*. Foram divididos em três tratamentos com três repetições. Em sua fase de alevino, foram distribuídos randomicamente em 9 caixas de 310L e, após o período de 40 dias de adaptação, os animais foram divididos em 3 grupos de tratamento: controle 1, 2 e 3; tratamento EP 0,5% 1, 2 e 3; tratamento EP 1% 1, 2 e 3. Os animais juvenis foram separados em aproximadamente 30 animais por caixa, totalizando 270 animais.

O sistema utilizado para a criação dos animais foi do tipo fechado, com a utilização de aquecedores de água (Roxin[®]), garantindo a temperatura ideal para o desenvolvimento dos animais, e bombas submersas (Grupo Sarlo, São Caetano Do Sul, São Paulo, Brasil) para oxigenação das caixas.

Durante trinta dias, realizaram-se a limpeza das caixas com a utilização de um sifão para retirada de resíduos existentes e limpeza das bombas submersas. A cada dois dias da semana, uma troca total e limpeza das paredes das caixas eram realizadas, abastecendo as caixas com uma água nova, utilizando tiosulfato de sódio (LabSynth[®], Diadema, Brasil), neutralizando-se o cloro para se evitar intoxicação dos animais na água, e sal sem iodo (Sal Boi Gordo[®], Brasil) para a prevenção de parasitoses. Os animais foram alimentados *ad libitum*, por um período de 30 dias e divididos em três grupos: grupo controle, que recebeu ração comercial (controle sem extrato); grupo

controle 1, que recebeu a ração com concentração do extrato em 0,5% e o grupo controle 2, que recebeu a ração com concentração de extrato em 1,0%.

4.3. Teste *in vitro* do Extrato Pirolenhoso: determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e da Concentração Bactericida Mínima (MBC) para *Streptococcus agalactie*

Na primeira parte do projeto, compreendendo os testes *in vitro*, foi utilizada a amostra do extrato pirolenhoso (EP) de *Eucalyptus globulus* cedido pela empresa AGTTEC. Dessa forma, foram realizados os testes de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC).

Para este ensaio, foi utilizado o método de Alves e colaboradores (2008) com adaptações. Um inóculo da bactéria *S. agalactie* foi cultivada em 10 mL de caldo BHI (HiMedia, Mumbai, Índia), de acordo com as recomendações do NCCLS (2003). Foram preparadas as diluições seriadas de base 2 do extrato pirolenhoso, assim como a diluição do controle positivo (Clorafenicol). Após incubação do inóculo, a suspensão bacteriana foi padronizada em 1×10^8 Unidade Formadoras de Colônia (UFC), sendo ajustada em espectrofotômetro DS-11 (DeNovix, EUA), ao comprimento de onda de 625nm, para 0,1 de absorbância, correspondendo ao ponto 0,5 da escala MacFarland (0,5 Mac). Após, aplicou-se a suspensão bacteriana nos poços da microplaca, compreendendo nos poços das 10 primeiras colunas um volume de 5 μ L da suspensão e 95 μ L de caldo BHI. Em seguida, foram adicionadas as diluições seriadas do extrato. No décimo primeiro poço, foi adicionado o controle negativo, consistindo-se apenas pelo caldo, e no décimo segundo poço, o controle positivo. Homogeneizou-se a placa que, em seguida, foi incubada a 37°C por 24 horas. Após a incubação, utilizou o corante vital (I8377 – Sigma) com concentração de 1mg/mL, com período de incubação de 3 horas. Em paralelo, foi realizada a Concentração Bactericida Mínima (MBC), onde os pontos iguais ou superiores ao MIC foram testados em placas contendo ágar BHI, por espalhamento, num volume de inóculo de 100 μ L, com incubação a 37°C por 24 horas. Após esse tempo, observou-se por possível crescimento de colônias nas placas.

4.4. Preparo da ração com o extrato pirolenhoso

A preparação da suplementação da dieta seguiu a metodologia proposta por Dairiki e colaboradores (2013) com algumas alterações. A suplementação foi realizada sobre ração comercial de crescimento normalmente utilizada na tilapicultura, sendo oferecida sem o aditivo (BRUM et al., 2016). Para cada quilograma de ração, uma solução de 100 mL do extrato pirolenhoso foi incorporada à ração por aspersão. Foram utilizadas duas concentrações do extrato: 0,5% e 1%. Na ração controle, somente foi incorporado um volume de 100 mL água deionizada. As rações contendo o aditivo e a ração controle foram colocadas para secagem, em temperatura ambiente (25°C) por 24 horas e, para armazenagem, foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados a -18°C. Durante a alimentação dos animais, a quantidade de 300 gramas foi adicionada em potes divididos por caixas de tratamento. Antes e após a alimentação, os potes eram pesados para recompor nova quantidade e armazenados a 4°C para sua posterior utilização.

4.5. Parâmetros de crescimento

O método de avaliação para crescimento foi calculado seguindo a metodologia proposta por Fu e colaboradores (1998), segundo as equações:

$$\text{Taxa de crescimento} = 100 \times \frac{[\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}]}{\text{tempo (dias)}}$$

$$\text{Taxa de conversão alimentar} = \frac{\text{consumo alimentar (g)}}{[\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}]}$$

4.6. Análises hematológicas e coleta de soro

Após 30 dias da suplementação com o aditivo, foram realizadas coletas de sangue dos animais para avaliação de parâmetros hematológicos. Os peixes foram anestesiados utilizando-se imersão em eugenol, seguindo o método descrito no Guia

Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais (2013) e com a metodologia descrita por Ranzani-Paiva e colaboradores (2013). O sangue foi coletado por punção caudal, com seringas de 1 mL contendo 1% de heparina sódica como anticoagulante.

Para o leucograma e trombograma, foram confeccionadas duas lâminas por peixe, contendo a identificação do espécime peixe e da caixa onde estava. Uma alíquota de sangue de cada animal foi colocada na lâmina e com outra lâmina limpa, em uma posição de 45°, fez-se o esfregaço. As lâminas foram submetidas à secagem em temperatura ambiente e, em seguida, procedeu-se a coloração. Foi utilizada a coloração May-Grünwald-Giemsa-Wright, contendo metanol PA – 1 L – eosina azul de metileno May-Grünwald, 0,53 g, e eosina azul de metileno Giemsa, 0,97g. Na coloração, cobriu-se a lâmina com algumas gotas do corante, e aguardou-se por 3 minutos. Após esse tempo, usando uma pisseta com água deionizada, cobriu-se a lâmina e aguardou-se por 10 minutos, em temperatura ambiente. Na sequência, descartou-se em recipiente o corante utilizado e lavou-se a lâmina com água corrente, procedendo, em seguida, à secagem. Para a contagem diferencial dos leucócitos, foi feita a varredura em microscópio óptico (Eclipse, Ci, Nikon NI, Tóquio, Japão) em formato de zigue-zague, sendo usada a objetiva de imersão (100X) e contados um total de 200 leucócitos. Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo o total a soma das médias das caixas, expressos em logaritmo de base 10. Para a contagem de trombócitos e leucócitos, seguiu-se a metodologia descrita acima, contando um total de 2000 eritrócitos e fazendo a contagem de leucócitos e trombócitos totais.

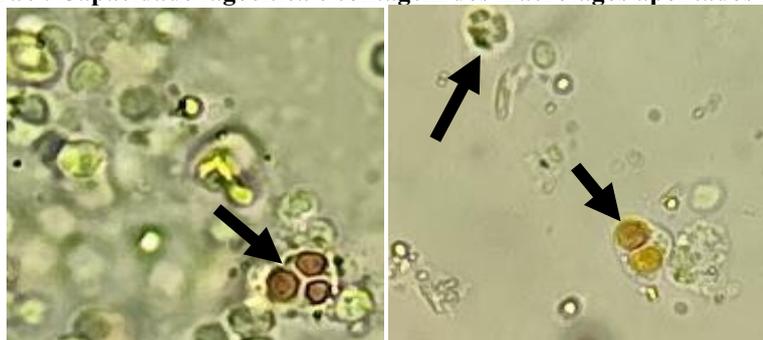
Para a contagem eritrocitária, utilizou-se a metodologia descrita por Ranzani-Paiva et al. (2013). Utilizaram-se 10µL do sangue dos animais, adicionados em 2 mL de solução formol-citrato (3 mL de formaldeído comercial 37%, 2,9 g de citrato de sódio e 100 mL de água destilada) em microtubos (Eppendorf[®], Alemanha). Para a contagem, homogeneizou-se a solução e adicionou-se uma alíquota, aproximadamente 5 µL do homogeneizado, nas porções superior e inferior da Câmara de Neubauer, e colocou-se a lamínula. A câmara foi colocada dentro de uma placa de Petri com algodão umedecido, esperando as células se aderirem na câmara. A contagem foi realizada em microscópio óptico (Eclipse, Ci, Nikon NI, Tóquio, Japão), na objetiva de 100X. A contagem foi feita nos cinco campos da câmara, considerando a diagonal superior esquerda até a diagonal inferior direita. Foram realizadas duas contagens, calculando-se a média de

cada peixe contado. Feita a contagem, os resultados foram expressos como as médias das caixas.

4.7. Atividade Fagocitária

Para essa análise, o método utilizado foi o proposto por Levy-Pereira et al. (2020). Os animais foram anestesiados em solução com eugenol e submetidos a uma incisão ventral com auxílio de bisturi. As cavidades celômicas dos peixes foram lavadas com 600 μ L de tampão HBSS contendo heparina 100 UI, formando-se uma suspensão celular. Esta foi colocada em microtubo plástico de 1,5 mL (Eppendorf[®], Alemanha) e centrifugada a $250 \times g$ por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram colocadas em lâmina de vidro, sobreposta por uma lamínula, sendo analisadas em microscópio óptico (Eclipse, Ci, Nikon NI, Tóquio, Japão). Para a atividade fagocitária, foram gerados dois parâmetros: a capacidade fagocítica (CF) que consiste no número de macrófagos fagocitando pelo número de macrófagos observados $\times 100$, e o índice fagocítico (IF), dado em porcentagem determinada em relação ao número de leveduras que foram fagocitadas dividido pelos macrófagos em atividade fagocitária (Figura 9).

Figura 9: Capacidade fagocítica e contagem dos macrófagos apontados na seta.



Fonte: Própria autoria, 2022.

4.8. Desafio com *Streptococcus agalactiae*

Após 30 dias de suplementação, 10 peixes de cada grupo (controle, tratamento EP 0,5% e EP 1%) foram separados em 9 aquários, totalizando 30 peixes por tratamento (Figura 10). Para controle do teste, foram usados 7 grupos separados da mesma condição dos grupos infectados, sendo usado o meio BHI como placebo. Estes peixes foram desafiados com *Streptococcus agalactiae*. Foi utilizada a cepa patogênica S.

agalactie (1×10^8 cels/mL) isolada de intestino de tilápia do Nilo, gentilmente fornecida pela Dra. Danielle de Carla Dias, Instituto de Pesca (IP) - Agência Paulista de Tecnologias de São Paulo, APTA, São Paulo, Brasil.

Figura 10: Distribuição de aquários e infecção dos animais.



Fonte: Própria autoria, 2022.

O ensaio foi realizado segundo a metodologia desenvolvida por Brum e colaboradores (2016) com alterações. O inóculo bacteriano, em caldo BHI, foi introduzido nos animais por injeção peritoneal, na dose de 1×10^8 UFCs mL⁻¹ por grama de peixe. Aplicaram-se 3 μ L da solução bacteriana na região peritoneal de cada peixe. Posteriormente à infecção, os animais foram observados a cada 3 horas por um período de 14 dias, no qual foram registrados os sinais clínicos e a mortalidade. Os peixes mortos foram retirados imediatamente dos aquários e descartados no lixo biológico.

4.9. Análise dos resultados

Os dados amostrais foram submetidos à análise de variância, tendo-se usado delineamento totalmente casualizado com 3 repetições. Após, as médias dos tratamentos foram comparadas utilizando-se o teste de significância a 5%. A estatística analisada foi realizada no software R, versão 3.4.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

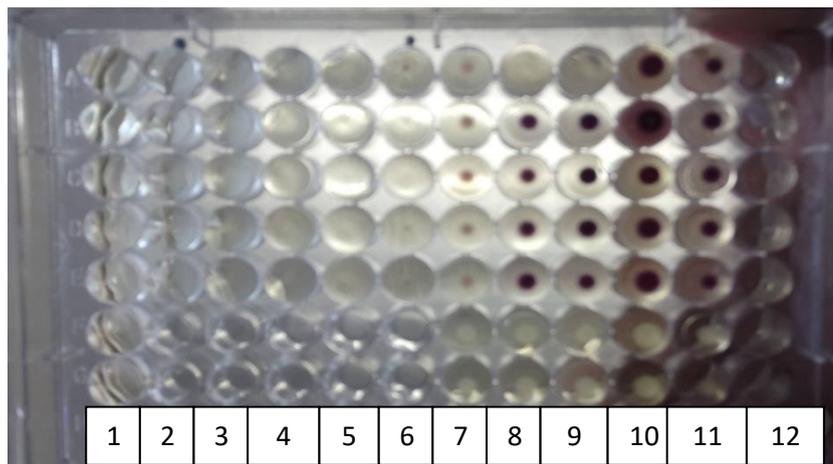
5.1. Teste *in vitro* – MIC e MBC

Para confirmação quanto ao possível efeito inibitório, foi realizado o MIC, com a metodologia descrita no item 3.1. Os testes foram realizados em cinco repetições, corando-se a placa para melhor resolução dos resultados (Figura 11). Na figura 11, nos primeiros poços, foram aplicados os extratos puros, verificando-se a inibição bacteriana. Do segundo poço até o décimo, foram realizadas as diluições, sendo a concentração inicial de 50 v/v e a final de 0,1 v/v. No décimo primeiro e décimo segundo poços foram realizados os controles negativo (somente bactéria) e positivo, com antibiótico clorafenicol a 2,5 v/v. O extrato líquido exibiu inibição de *S. agalactiae*, assim como nas concentrações de 6,25 v/v, demonstrando o potencial inibidor do EP frente ao *S. agalactiae*. Após esses resultados, avaliou-se a Concentração Bactericida Mínima (MBC). Os resultados demonstraram atividade bactericida utilizando a concentração de 25 v/v, indicando o potencial de uso do EP como um possível aditivo em rações (Figura 12).

A aplicação de produtos naturais tem ganhado cada vez mais relevância tanto em investigações básicas como nas áreas mais aplicadas, incluindo a produção animal. Dessa forma, a caracterização de novos compostos visando o aumento de produtividade torna-se importante principalmente na aquicultura, uma vez que os organismos aquáticos, principalmente peixes de produção, têm sido submetidos a manejos com antibióticos em dosagens ou períodos de aplicação muitas vezes inadequados, gerando condições propícias para a seleção de cepas bacterianas patogênicas multirresistentes e, conseqüentemente, mortalidade e perda econômica para o produtor (CABELLO, 2006).

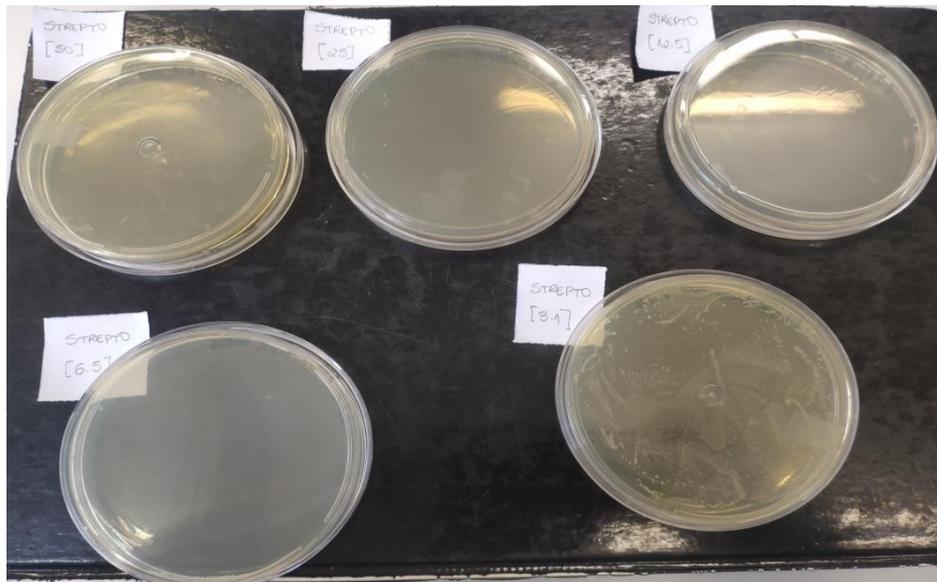
Muitos extratos vegetais têm tido efeitos positivos sobre alguns parâmetros zootécnicos, assim como na modulação da resposta imune, tornando-se alternativas viáveis ao uso indiscriminado de antibióticos nos plantéis.

Figura 11: Concentração Inibitória Mínima (MIC) de *S. agalactiae* com a utilização de EP.



Legenda: No 1º poço, foi aplicado o extrato puro, sem diluição. Do 2º ao 10º poço, foram aplicadas as diluições dos extratos, sendo: no 2º poço, concentração de $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$, no 3º poço $25\mu\text{g}/\mu\text{l}$, até parar no 10º poço, com $0,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de concentração. C- é o controle negativo, no qual tem a bactéria *S. agalactiae*, e em C+, uso do antibiótico Clorafenicol para inibição da bactéria. Observa-se que, a partir de uma concentração de $3,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para o extrato, ocorre inibição do crescimento bacteriano. Fonte: Própria autoria, 2022.

Figura 12: Concentração Bactericida Mínima (MBC) de *S. agalactiae* com a utilização de EP.



Legenda: Na primeira placa de Petri, apresenta a concentração de 50 v/v, que não contém crescimento na placa. Observa-se crescimento bacteriano no ponto 3.1 v/v, demonstrando o potencial bactericida do EP. Fonte: Própria autoria, 2022.

Nesse sentido, o extrato pirolenhoso gera grande interesse para utilização como aditivo em rações comerciais não somente de tilápias, mas também de outras espécies comerciais. Contudo, não há estudos demonstrando a eficiência deste extrato sobre a bactéria *S. agalactiae* e se há efeito positivo sobre a produção de tilápias, necessitando-

se de estudos inovadores para se verificar o potencial do extrato pirolenhoso como agente antimicrobiano e possível aditivo na dieta de tilápias.

Em uma primeira avaliação, a fim de se averiguar esses potenciais efeitos, os resultados *in vitro* indicaram resposta eficiente, tanto bacteriostática como bactericida produzida pelo extrato contra cepa *S. agalactiae* isolada de peixes, mostrando que o extrato puro já apresentava uma resposta antibacteriana, necessitando-se saber a partir de qual diluição ocorreriam à inibição e morte bacterianas.

Dessa forma, os resultados apresentam uma resposta eficiente contra uma das principais bactérias de criação de tilápia do Nilo, apresentando o mesmo efeito quando comparado ao trabalho de Rezende (2018) que, utilizando diferentes óleos voláteis, como de tomilho, capim limão, entre outros, verificou uma resposta efetiva desses compostos contra bactérias de pisciculturas, como *Aeromonas hydrophilia* e *S. agalactiae*. Assim, verificado o potencial, aplicou os diferentes compostos em ração comercial a fim de se obter uma melhora no crescimento, na imunidade e sobrevivência do plantel.

5.2. Parâmetros de crescimento e ganho de peso

A tabela 1 mostra os resultados obtidos para os parâmetros de crescimento comparando-se as médias das caixas utilizadas durante a pesquisa. Quando analisados os resultados, não houve diferença significativa entre os grupos e tratamentos EP 0,5% e EP 1%, respectivamente (P-Valor < 0,05), significando que o crescimento apresentou uma similaridade tanto para o grupo controle quanto para os grupos de tratamento.

Analisando-se as médias, em termos absolutos, apesar de o grupo controle apresentar um maior comprimento nos tamanhos, observa-se que a taxa de crescimento do EP 1% apresentou uma maior média, enquanto o grupo controle e o grupo EP 0,5% tiveram a mesma média de crescimento.

Tabela 1: Crescimento dos animais após 30 dias de alimentação.

Tratamento	CI (cm)	CF (cm)	Crescimento (cm)
Controle	9.5 ± 0.4	13.2 ± 0.3	3.7 ± 0.5
0,5%	8.6 ± 0.1	12.3 ± 0.1	3.7 ± 0.1
1%	8.3 ± 0.1	12.4 ± 0.1	4.1 ± 0.1
P-Valor	0,178	0,265	0,866

Legenda: CI: Comprimento inicial; CF: Comprimento final; cm: centímetros, e crescimento das caixas analisadas, após 30 dias de alimentação. Resultados foram expressos com média ± desvio padrão. Fonte: Própria autoria, 2022.

O crescimento dos animais apresentou resultados similares comparados aos de Tachibana e colaboradores (2020) que, após a aplicação de probióticos de 0,02% a 0,08%, não verificaram interferência na taxa de crescimento quando os dados foram comparados aos do grupo controle. Vale destacar também que algumas rações comerciais não apresentam uma melhora no crescimento, podendo ser necessário suplementar com aditivos comerciais que promovem essa melhora com um menor tempo de produção (KORD et al., 2021). Em um viés de comparação, o EP também ajudou no crescimento dos animais mesmo com uma concentração menor, indicando um possível auxílio no desenvolvimento dos animais, como visto também em Silva e colaboradores (2018) que, ao utilizarem proteína crua, também verificaram um maior aumento de crescimento dos animais, sugerindo sua utilização em rações comerciais.

A tabela 2 apresenta os parâmetros de Peso Médio Inicial e Final (PMI e PMF), respectivamente, o Ganho de Peso (GP), Ganho de Peso Médio (GPM) e Ganho de Peso Médio Diário (GPMD) e a Conversão Alimentar (CA). Destaca-se que após a aclimatação dos animais, os grupos EP 0,5% e EP 1% não apresentaram recusa do alimento, alimentando-se duas vezes por dia. Após os 30 dias, os resultados não apresentaram nenhuma diferença significativa para os parâmetros analisados (P-Valor <0,05) entre o grupo controle e os tratamentos.

Apesar de não haver diferença significativa entre os dados, observa-se que o grupo controle apresentou um leve aumento no GP, GPM e GPMD quando comparado aos tratamentos, enquanto os tratamentos EP 0,5% e EP 1% apresentaram valores similares nesses parâmetros, indicando que mesmo com o aumento da concentração não há interferência no ganho de peso dos animais.

Tabela 2: Comparações de peso e conversão alimentar, tendo os pesos médios, ganho de peso e conversão alimentar dos animais após 30 dias de alimentação.

Tratamento	PMI (g)	PMF(g)	GP (g)	GPM (g)	CA	GPMD (g)
Controle	13.7 ± 1.1	48.2 ± 3.7	1036.6 ± 79.9	34.5 ± 2.6	0.88 ± 0.01	1.33 ± 0.1
0,5%	12.7 ± 0.5	41.8 ± 0.9	874 ± 13.1	29.1 ± 0.4	0.99 ± 0.02	1.12 ± 0.01
1%	11.6 ± 0.3	40.8 ± 1.2	875.6 ± 36.2	29.2 ± 1.2	1.15 ± 0.09	1.12 ± 0.04
P-Valor	<i>0,463</i>	<i>0,353</i>	<i>0,312</i>	<i>0,312</i>	<i>0,181</i>	<i>0,3</i>

Legenda: PMI: Peso Médio Inicial, PMF: Peso Médio Final, GP: Ganho de Peso, GPM: Ganho de Peso Médio, CA: Conversão Alimentar; GPMD: Ganho de Peso Médio Diário. Fonte: Própria autoria, 2022.

Sobre a utilização do EP para ganho de peso em rações comerciais, não há estudos anteriores que demonstrem essa relação de EP com a melhora do peso do

animal. Ainda assim, há estudos que mostram aumento no peso dos animais quando alimentados com alguns extratos. Como exemplo, Sivaram e colaboradores (2004) mostraram que houve um aumento na taxa específica de comprimento após a utilização de extrato metanólico de manjerição sagrado (*Ocimum sanctum*) em doze dias de alimentação para garoupas (*Epinephelus tauvina*).

Há também estudos indicando que animais, mesmo recebendo um aditivo, não apresentam uma melhora no seu peso, como visto no trabalho de Brum e colaboradores (2016), no qual aplicando-se diferentes concentrações de extrato de gergilim e extrato de manjerição, somente o grupo que recebeu 0,5% de manjerição apresentou um resultado melhor de crescimento quando comparado aos outros grupos, sendo que os outros grupos não tiveram diferenças significativas, apontando igual valor de crescimento quando comparado ao grupo controle.

Esses fatores podem estar relacionados com diferentes aspectos que estão presentes nos animais, como a área de absorção intestinal, a digestibilidade dos nutrientes, entre outros (YUKGEHNAISH et al., 2020). Mesmo alguns imunostimulantes sendo utilizados comercialmente, alguns estudos mostram que esses não diferem de rações comerciais quando relacionados ao ganho de peso do animal, tendo KORD e colaboradores (2021) demonstrando que a taxa de conversão alimentar de peixes, parâmetro utilizado para medir a eficiência do aproveitamento da ração oferecida aos animais, foi menor quando aplicado o Sanolife PRO-F, mesmo este apresentando uma melhora no ganho de comprimento dos animais.

Os resultados demonstram que a utilização do EP na ração comercial não apresentou uma diferença com o ganho de peso e de crescimento, apontando também uma taxa de crescimento e conversão alimentar próximas ao grupo controle. Assim, foram realizados os ensaios hematológicos para avaliar os índices hematopoiéticos dos animais.

5.3. Contagem Total: eritrócitos, leucócitos e trombócitos

O gráfico 1 apresenta os dados de contagem total, sendo divididos em eritrócitos, trombócitos, leucócitos, respectivamente. Nos dados relacionados com a contagem eritrocitária, houve diferença significativa quando comparadas as médias entre grupo controle e tratamento EP 1% (P-Valor < 0,05).

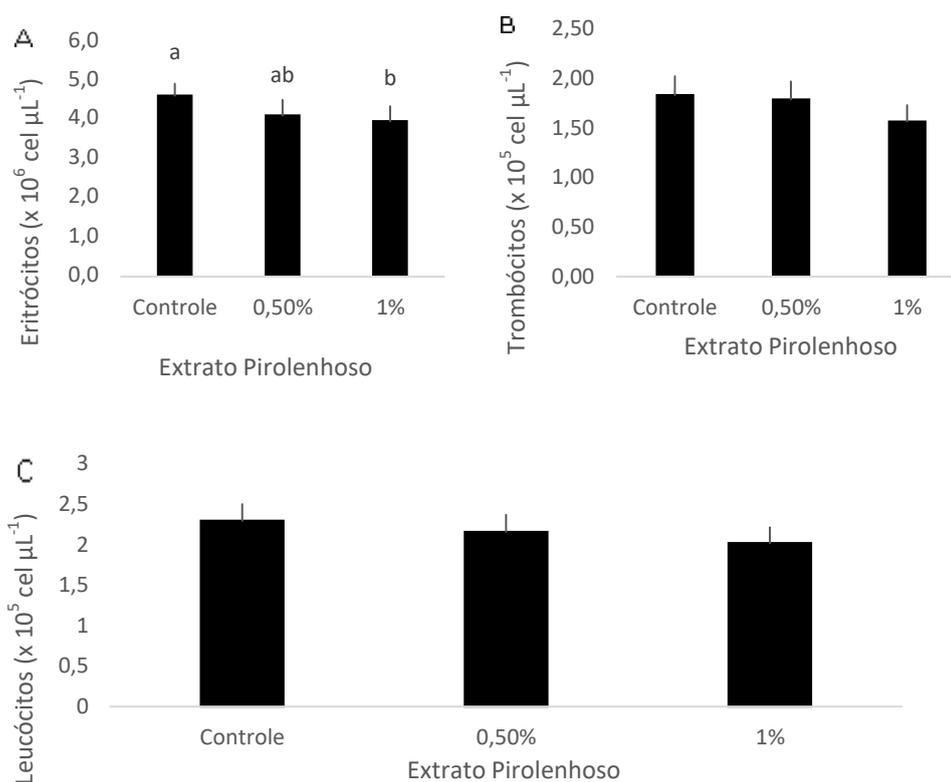
Com relação aos trombócitos, não houve diferença significativa, tendo o grupo controle e o grupo EP 0,5% contagens similares, enquanto o grupo EP 1% apresentou uma redução. Também não houve diferença significativa na contagem leucocitária, demonstrando uma média similar entre os três grupos analisados.

Como não há um padrão, em termos de quantidade, estabelecido na literatura sobre essas séries de contagens diferencial e total, utiliza-se o grupo controle como referencial padrão (NAKANDAKARE, 2013).

De um modo geral, os eritrócitos são as células mais abundantes dos animais, tendo como principal função carrear o oxigênio (O₂) para os tecidos e órgãos, além de retirar gás carbônico (CO₂), evitando o acúmulo deste dentro do organismo, tornando-o tóxico para as células (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Assim, o grupo controle apresentou maior presença dessas células quando comparado com os tratamentos. Os eritrócitos são um dos fatores indicativos para uma boa saúde dos animais; porém, fatores como manejo e estado nutricional, por exemplo, podem interferir nessa contagem (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004), além de que o perfil hematológico de algumas espécies está ligado a particularidades fisiológicas e possíveis fatores ambientais (NEGRETE et al., 2009). Mais além, Rezende (2018) mostrou que após aplicação dos extratos nas rações e coleta do sangue, os animais não tiveram alterações quando comparados aos grupos controle e antibiótico.

Gráfico 1: Contagem total de hemácias: eritrócitos, trombócitos e leucócitos.



Legenda: em A, contagem dos Eritrócitos, em B contagem dos Trombócitos, em C contagem dos Leucócitos, sendo os resultados expressos pelas médias das caixas. Fonte: Própria autoria, 2022.

Com relação aos trombócitos e leucócitos, ambas são células que estão relacionados com mecanismos de coagulação sanguínea e com a resposta imune do peixe, respectivamente. Os trombócitos auxiliam na defesa orgânica, na fagocitose e migração para o foco inflamatório, enquanto os leucócitos estão associados a resposta imune inata, perfazendo uma primeira linha de defesa dos animais (TAVARES-DIAS et al., 2007; RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Como não ocorreu uma queda acentuada tanto na contagem dos trombócitos como na contagem leucocitária, os resultados mostram que a adição de EP manteve os níveis basais quando comparados ao grupo controle, divergindo do trabalho de BRUM e colaboradores (2016) onde uma queda nos parâmetros hematológicos com o grupo 1,5% do óleo de gengibre foi relatada. Corroborando com os resultados apresentados, REZENDE (2018) não verificaram alterações dos níveis basais dos leucócitos nos grupos tratados com os óleos voláteis quando comparados ao grupo controle. Há também estudos que apresentam uma melhora desses parâmetros hematológicos, quando a ração é suplementada com aditivo, seja um imunoestimulante, seja um

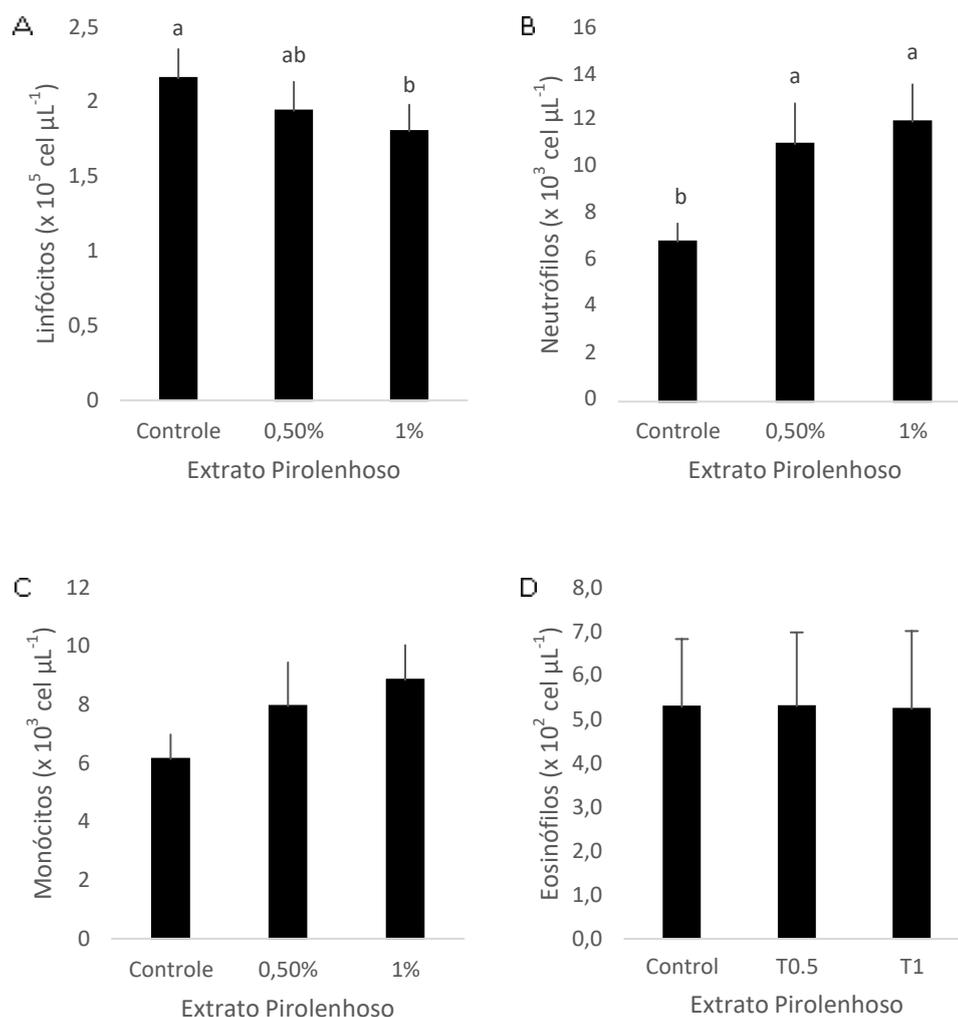
probiótico, ambos apresentam uma boa capacidade de melhorar esses parâmetros e melhorar a resposta imune (KORD et al., 2021).

5.4. Contagem diferencial das células sanguíneas

No gráfico 2, os resultados apresentados são da contagem diferencial dos leucócitos, sendo estes divididos em: linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. A contagem linfocitária mostrou uma maior média na contagem do grupo controle quando comparado ao grupo EP 1%, que se diferiram de maneira estatisticamente significativa (P-Valor < 0,05), enquanto o grupo EP 0,5% não diferiu estatisticamente do grupo controle e do grupo EP 1%. Comparando as médias dos neutrófilos, contudo, houve uma queda acentuada na contagem do grupo controle em comparação aos grupos EP 0,5% e EP 1% que apresentaram uma maior contagem, diferindo-se estatisticamente do grupo controle.

Nas contagens de monócitos e eosinófilos, não houve diferenças significativa entre os três grupos, sendo que na contagem dos monócitos, EP 0,5% e EP 1% apresentaram maiores contagens, enquanto que o eosinófilo apresentou uma mesma média para todos os grupos, não havendo diferença significativa entre eles.

Gráfico 2: Contagem diferencial leucocitária de Linfócitos, Neutrófilos, Monócitos e Eosinófilos.



Legenda: Em A, contagem dos Linfócitos, em B, contagem dos Neutrófilos, em C, contagem dos monócitos e em D, contagem dos Eosinófilos. Os resultados foram expressos pelas médias das caixas com \pm erro padrão. Fonte: Própria autoria, 2022.

Estas células são essenciais para as respostas imunes celulares, atuando em processos inflamatórios, entrada de patógenos no organismo, concorrendo para a interação entre as respostas e adaptativa de maneira mais eficiente (BAVIA et al., 2022).

Os linfócitos e os monócitos são células agranulócitas, sendo que os linfócitos estão presentes em maior quantidade e apresentam três tipos funcionais: linfócitos B, linfócitos T e os *natural killers* (NK ou citotóxicos). Já os monócitos são conhecidos como os precursores dos macrófagos, sendo que essas células podem ficar presentes por um longo tempo no organismo. Os neutrófilos e os eosinófilos são granulócitos por

apresentarem grânulos em sua morfologia, sendo os neutrófilos as células leucocitárias mais abundantes no organismo, tendo uma vida média na circulação sanguínea muito curta. Sua principal função é a fagocitose e degradação de bactérias. No caso dos eosinófilos, são células grandes e fáceis de identificar em um esfregaço sanguíneo, e tem como função atuar, principalmente, contra parasitas, contendo grânulos citotóxicos em sua estrutura (TESLER, YOUNG & BALDWIN, 2008).

No presente estudo, o grupo controle apresentou uma elevada contagem de linfócitos quando comparado aos tratamentos, que apresentarem redução na quantidade dessas células. Este resultado é similar aos apresentados por BARROSO e colaboradores (2014) que observaram redução do número dessas células em grupos de *Solea senegalensis* alimentados com ração mais probiótico, em comparação ao grupo controle. Também no trabalho de BRUM et al. (2016), os peixes da espécie *O. niloticus* apresentaram queda na contagem nessas células quando utilizados os óleos de gengibre (MAZEAUD et al., 1977; RINJBERK & MOL, 1997; REZENDE, 2018).

Com relação aos neutrófilos e aos monócitos, os grupos com tratamento apresentaram maiores contagens comparados ao grupo controle. Esses resultados são similares aos obtidos por TACHIBANA e colaboradores (2020), ao utilizarem concentrações diferentes de probióticos na alimentação de peixes, promovendo um aumento nas contagens dessas células. Também há estudos indicando que o uso de óleos essenciais não altera negativamente esses parâmetros, como no trabalho realizado por SHOURBELA e colaboradores (2021), onde o óleo essencial de orégano, adicionado na alimentação, não apresentou provocou redução nas contagens de células associadas à imunidade.

Os eosinófilos não apresentaram diferença em nenhum dos grupos, sendo um dos principais motivos provavelmente à ausência de parasitas (NAKANDAKARE et al., 2013), similarmente a outros estudos que corroboram esses resultados.

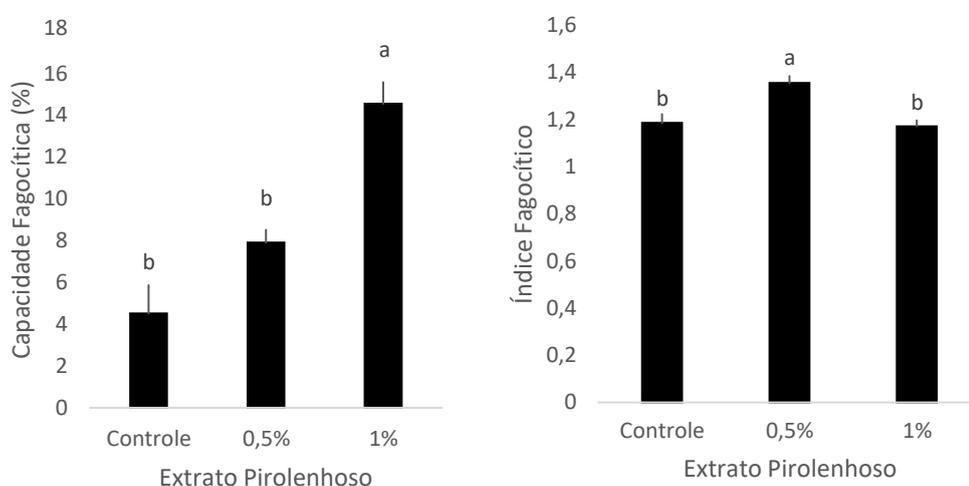
5.5. Capacidade Fagocítica e Índice Fagocítico

No gráfico 3, são mostrados os resultados obtidos da Capacidade Fagocítica (CP) e do Índice Fagocítico (IF), respectivamente. Após 30 dias da suplementação, houve diferença significativa na capacidade fagocítica entre o grupo tratamento EP 1%

quando comparado com os grupos controle e grupo tratamento EP 0,5% ($P=0,00022$), demonstrando uma maior presença de macrófagos após a suplementação da ração com 1% do extrato e, conseqüentemente, uma melhora no efeito imunocompetente dos animais com essa suplementação. Comparando os grupos controle e tratamento EP 0,5%, o grupo de tratamento EP 0,5% apresentou um leve aumento quanto comparado ao grupo controle; contudo, são similares em termos de comparação estatística.

Com relação ao IF, foi observado que o EP 0,5% apresentou um maior índice de macrófagos fagocitando as leveduras, diferindo estatisticamente dos grupos controle e EP 1%, os quais apresentaram índices de fagocitose similares.

Gráfico 3: Capacidade fagocítica (CP) e Índice fagocítico (IF) de *O. niloticus*.



Na esquerda: Capacidade Fagocítica com grupamento controle (sem EP), tratamento com EP 0,5% e EP 1%. No gráfico a direita: Índice Fagocítico, com grupamento controle (sem EP), tratamento com EP 0,5% e EP 1%. Fonte: Própria autoria, 2022.

Esses dados demonstram uma melhora na resposta imunológica do organismo quando suplementados com EP 0,5 ou EP 1%. Diversos estudos têm comprovado uma melhora da imunidade quando aplicados diferentes tipos de aditivos como probióticos, óleos essenciais, entre outros. Em estudo feito por Pirarat e colaboradores (2006), mostraram um aumento da CP e IF de *O. niloticus* após duas semanas de alimentação com probiótico.

Os resultados apresentados também corroboram com o trabalho realizado por NAKANDAKARE e colaboradores (2013), quando verificaram um CF maior após a

adição de probiótico em comparação ao grupo controle, sugerindo uma melhora da resposta imune.

O IF considera a quantidade de leveduras encontradas dentro dos macrófagos após terem sido fagocitados por estes (NAKANDAKARE et al., 2013), sendo a fagocitose uma primeira linha de resposta imunológica frente aos patógenos (HAUGLAND et al., 2012; HAN et al., 2021). O grupo EP 0,5% apresentou uma maior quantidade dessas leveduras dentro dos macrófagos, em comparação aos animais alimentados com EP 1%, cujos macrófagos fagocitaram menos. Este resultado demonstra que, apesar do EP apresentar um potencial imunoestimulante, este pode começar a causar efeitos de exaustão defensivos nas células, como apresentado em trabalho de Brum e colaboradores (2016) no qual o índice fagocítico apresentou uma queda depois de estender o uso de ração suplementada com gengibre 1,5% por 55 dias, apesar do gengibre apresentar excelentes propriedades imunoestimulatórias (DUGENCI et al., 2003).

5.6. Desafio frente *S. agalactiae*

Na tabela 3, estão indicados os resultados das médias dos aquários sobre a mortalidade dos animais e a porcentagem relativa de sobrevivência (PRS), utilizando o método por AMEND (1981), expressos em porcentagem, sendo utilizados 10 animais por aquário em 3 repetições, totalizando 30 animais. Os resultados não apresentaram diferença significativa entre os grupos controle e tratamentos ($P \leq 0,05$). O gráfico 4, correlaciona o número da soma dos peixes mortos por dia da infecção por grupo de tratamento. Após o primeiro dia da infecção, nenhum dos grupos recebeu alimentação. A confirmação da infecção foi feita através da observação dos sinais clínicos dos animais infectados, estando presentes a exoftalmia, natação errática e ascite (CHEN et al., 2012; LEIRA et al., 2016).

Tabela 3: Mortalidade e PRS de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) dez dias após o desafio com *S. agalactiae*.

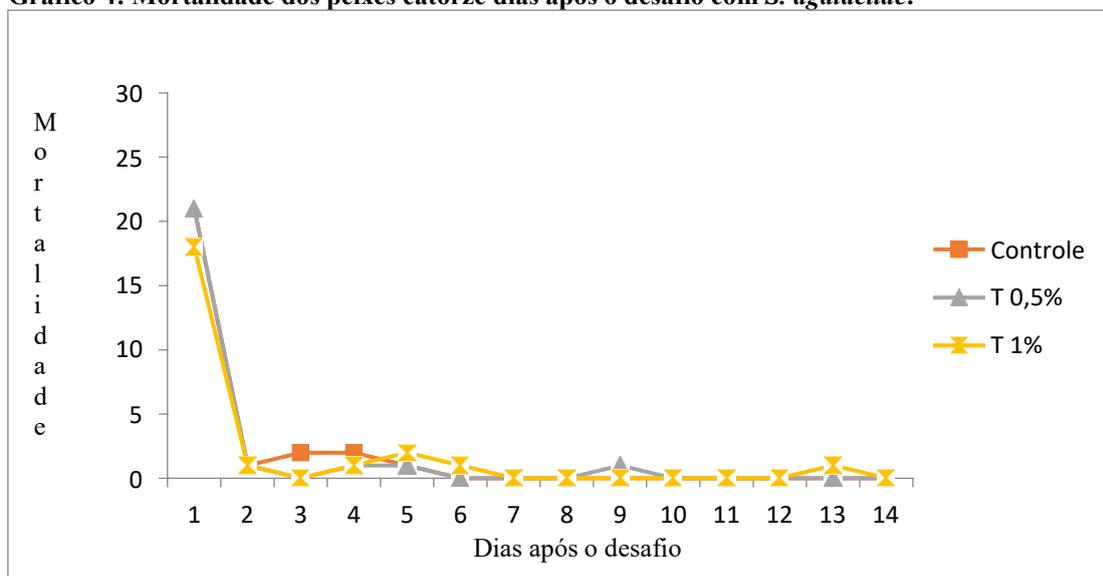
Tratamento	Mortalidade (%)	(PRS %)
Controle	90	10
EP 0,5%	90	10
EP 1%	83	17

Legenda: Mortalidade dos animais expressos em porcentagem; PRS: Porcentagem Relativa de Sobrevivência.

Fonte: Própria autoria, 2022.

Houve uma rápida infecção e aumento no nível de mortalidade dos animais logo no primeiro dia do desafio, demonstrando a progressão da doença que foi descrita por FIGUEIREDO e colaboradores (2006). Nos dias posteriores, as mortalidades acabaram diminuindo, demonstrando uma taxa de sobrevivência em torno de 10% entre os grupos controle e tratamento 0,5%, enquanto o grupo tratamento 1% apresentou sobrevida um pouco maior quando comparado aos outros dois grupos.

Gráfico 4: Mortalidade dos peixes catorze dias após o desafio com *S. agalactiae*.



Legenda: Mortalidade dos peixes após 14 dias do desafio. Em laranja, grupo controle, em cinza Grupo Tratamento EP 0,5% e em amarelo, grupo Tratamento EP 1%.

Fonte: Própria autoria, 2022.

Uma das hipóteses para explicar essa alta mortalidade pode estar relacionada com o tamanho e peso dos peixes, porque estes animais estavam em sua fase juvenil, sendo essa fase e a larval as que mais apresentam vulnerabilidade a infecções e maior

probabilidade de adquirirem doenças (TAKESHITA et al., 2019), superando eventuais efeitos imunestimulatórios das concentrações de EP utilizadas. Os peixes utilizados durante o experimento apresentaram uma pesagem abaixo dos 50 gramas. Este pode ter sido um fator que influenciou essas porcentagens de mortalidade (MIAN et al., 2009).

Outro fator que pode estar associado seria a temperatura, uma vez que o patógeno ocasiona mortalidade em temperaturas acima dos 27°C; muito embora, durante o desafio, a temperatura foi mensurada e controlada por termostato para não ocorrer variações que eventualmente colaborariam para a ocorrência da doença (MARCUSO et al., 2015).

Com relação ao EP, ainda não há estudos demonstrando sua utilização em rações comerciais; por esse motivo, as concentrações foram definidas em trabalhos utilizando essas taxas de 0,5% e 1%. Há trabalhos utilizando óleos voláteis que demonstram maior mortalidade em grupos de 0,5% do que em grupos de 1%. Por exemplo, em trabalho de VAZIRZADEH, JALALI e FARHADI (2019), ao utilizarem extrato de *Olivaria decumbens* em comparação com águas aromáticas da mesma, a fim de avaliarem qual apresentação apresentava maior efeito imunestimulatório, verificou-se que 1% do extrato apresentou um aumento melhor na imunidade e consequente redução da mortalidade dos animais.

6. CONCLUSÕES

Os ensaios *in vitro* realizados revelaram efeito antimicrobiano do extrato pirolenhoso frente a *S. agalactiae*. O MIC realizado indicou inibição bacteriana em baixas concentrações de 1,25 v/v, enquanto o MBC apresentou efeito bactericida em menos de 50 v/v.

Os parâmetros de ganho de peso e tamanho médio não apresentaram diferença significativa entre a ração comercial e os tratamentos EP 0,5% e EP 1%.

Na contagem total das células sanguíneas, o grupo controle apresentou uma maior quantidade de eritrócitos e trombócitos com relação aos grupos submetidos aos tratamentos, porém não houve diferença significativa na contagem leucocitária.

Nas contagens diferenciais, o grupo controle apresentou uma maior quantidade de linfócitos, mas os tratamentos apresentaram maior contagem de monócitos e neutrófilos, promovendo maior capacidade fagocítica, tendo o grupo EP 0,5% um maior índice fagocitário, estatisticamente significativo, indicando uma otimização da resposta imune dos animais.

Contudo, quando realizado o desafio, houve uma alta taxa de mortalidade em todos os grupos.

Nesse contexto, o presente estudo contribui para um melhor entendimento dos efeitos do extrato pirolenhoso como um aditivo de ração para peixes e abre perspectivas para novas investigações na prospecção de antimicrobianos naturais que possam ser utilizados com segurança e eficiência na piscicultura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSALI, H., MOHAMAD, S. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n. 13, p. 1839–1847, 2012.

AGTTEC. Uniformização e caracterização do Extrato Pirolenhoso. **Instituto de Química, UNESP**. p. 1 – 34, 2011.

ALMEIDA, R. S. R. et al. Potential of Pyroligneous Extract of Eucalyptus Wood as a reservative of Cosmetic and Sanitizing Products. **Waste and BioMass Valorization**, n. 10, p. 1111-1118, 2019.

ALVES, M. J. et al. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**. v. 115, p. 346-357, 2013.

AMEND, D. Potency testing of fish vaccines. **Developmental Biology Stanford**. v.49, p.447 – 454, 1981.

ARAÚJO, E. S. Potencial antibacteriano e antifúngico do extrato pirolenhoso. 2018. 49 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias – UAECIA, Macaíba, Rio Grande do Norte, 2018.

BARROSO, C. et al. Immune responses and gut morphology in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed dietary probiotic supplementation and following exposure to *Photobacterium damsela* subs. *piscida*. **Aquaculture Research**.v. 47, p.951 – 90, 2014.

BAVIA, L. et al. Advances in the complemente system of teleost fish, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 123, p. 61-74. 2022.

BILLER-TAKAHASHI, J. D. et al. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal Biology**. v. 73. p. 425-429, 2013.

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

BORUSK, A. C. Um estudo sobre o ácido pirolenhoso, com ênfase na técnica de obtenção e aplicação na agroecologia. Videira, Santa Catarina: Universidade do Oeste de Santa Catarina, p. 27. 2009.

BRASIL. Anuário PeixeBR da agricultura. Disponível em: <www.peixebr.com.br>. Acesso em: 05 de julho de 2022.

_____. 2019. Pesca e aquicultura. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/contando-ciencia/pesca-e-aquicultura/>>. Acesso em: 18 de julho de 2019.

BRASÍLIA. Guia brasileiro de boas práticas em eutanásia em animais – conceitos e procedimentos recomendados. Brasília: Josemar Aragão/ASCOM/CFMV, 2013. 59 p.

BRUM, A. et al. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*. v. 468, p. 235-243, 2017.

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

CAMARGO, S., POUEY, J. L. O. F. Aquicultura – um mercado em expansão. ***Revista Brasileira de Agrociência***, v. 11, n.4, p. 393 – 396, 2005.

CARNEIRO, P. C. F. et al. Produção Integrada de Peixes e Vegetais em Aquaponia. ***Embrapa***. 1ª edição. 2015.

CHEN, M. et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China. ***Veterinary Microbiology***, n. 159, p.526–530, 2012.

CHIDEROLI, R. T. et al. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. ***Aquaculture***. n. 479, p. 45-51, 2017.

DADAR, M., et al. Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. ***Reviews in Fisheries Science & Aquaculture***. p. 1-34, 2017.

DAIRIKI, J. D. et al. Procedimento para Inclusão de Óleos Essenciais em Rações para Peixes. Circular Técnico da EMBRAPA. p. 1 – 8, 2013.

DAS CHAGAS CARDOSO FILHO, F. et al. Qualidade higiênico sanitária da ração utilizada em piscicultura. ***Revista do Instituto Adolfo Lutz***, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 391-394, 2011.

DAVIES, J. Where have all the antibiotics gone? ***Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology***, v.17, n.5, p. 287, 2006.

DONE, H. Y; VENKATESAN, A. K; HALDEN, R. U. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? ***The APPS Journal***. v.17, n.3, p. 512 – 524, 2015.

DOTTA, G. et al. Acute inflammatory response in Nile tilapia fed *Lactobacillus plantarum* in the diet. ***Acta Scientiarum Biological Sciences***. v. 33, p. 239 - 246, 2011.

DUGENCI, S. K., ARDA, N., CARDAN, A. Some medicinal plants as immunostimulants for fish. ***Journal of Ethnopharmacology***. v. 88, p. 99 – 106. 2003.

ELLIS, A. E. Lysozyme activity. In: STOLEN, T. C. et al. ***Technique in Fish Immunology***. USA: SOS publications, 1990. p. 101- 103.

EVANS, J.J. et al. Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). ***Emerging Infectious Disease***. v.15, n.5, p. 774–776, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. The state of world fisheries and aquaculture. 2021. Disponível em: <www.fao.org/fishery/aquaculture/en>. Acesso em: 8 de agosto de 2019.

_____. The state of world fisheries and aquaculture. 2012. Disponível em: <www.fao.org/fishery/aquaculture/en>. Acesso em: 15 de agosto de 2019.

FRASCÁ-SCORVO, C. M. D; FILHO, J. D. S. A piscicultura. **Pesquisa e tecnologia**. v.8, n.2, p. 1-4, 2011.

FERNANDES, A. S. 2014. Amostragem de Ectoparasitos de Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) em cultivo comercial.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. *Streptococcus agalactiae* associado a meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 4, p. 678 – 680, 2006.

FURUYA, W. M. et al. Fitase em rações para peixes juvenis de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Boletim Instituto do Pesca**. v. 34, 489 – 496, 2008.

FU, C. et al. Growth and feed utilization by F4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. **Journal of Fish Biology**. v. 53, p. 115–129, 1998.

GODOY, S. H. S. Ocorrência de aflatoxinas em rações de tilápias (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. 2018.68f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo. 2018.

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

GOMES, M. J. P. Gênero *Streptococcus* spp. Disponível em: <www.ufrgs.br/labacvet/pdf/strepto200902.pdf>. Acesso em: 22 de agosto de 2019.

HAN, H. et al. Impact of high dietary cornstarch level on growth, antioxidant response, and immune status in GIFT tilapia *Oreochromis niloticus*. **Scientific Reports**. v.11, n. 6678, p. 1-10, 2021.

HAUGLAND, G. T. et al. Phagocytosis and respiratory burst activity in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.) leucocytes analysed by flow cytometry. **PLoS ONE**. v.7, n.10, p.1 -11, 2012.

IGARASHI, M.A. Característica do agronegócio da tilápia cultivada no Brasil: uma força ascendente. **PUBvet**, v. 2, n. 25, p. 18, 2008.

IREGUI, C. et al. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* and streptococcosis in tilapia (*Oreochromis* sp.). **Research gate**. 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/PaolaBarato/publication/261876026_Epidemiology_of_Streptococcus_agalactiae_and_streptococcosis_in_tilapia_Oreochromis_sp/links/0a85e535c0b6079009000000/Epidemiology-of-Streptococcus-agalactiae-and-streptococcosis-in-tilapia-Oreochromis-sp.pdf>. Acesso em: 25 de maio de 2022.

- ISHIKAWA, N. M., RANZANI-PAIVA, M. J. T., LOMBARDI, J. V. Total leukocytes counts methods in fish, *Oreochromis niloticus*. *Archives of Veterinary Science*. v. 13, n. 1, p. 54 – 63, 2008.
- IZQUIERDO, M. S. et al. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*. v. 197, p. 25-42, 2001.
- KOBAYASHI, M. et al. Fish to 2030: The role and Opportunity for Aquaculture. *Aquaculture Economics & Management*. v. 19, n. 3. p. 282 – 300. 2015.
- KORD, M. I. et al. Commercial Feed Additives on Growth Performance, Non-specific Immune Response, Antioxidantes Assay, and Intestinal Morphometr of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Frontiers in Physiology*. v. 12, p. 1 – 12, 2021.
- KUBITZA, F. Manejo na produção de peixes. *Panorama da Aqüicultura*, n.19, p. 14-23, 2009.
- KUEBUTORNE, F. K. A., ABARIKE, E. D., LU, Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*. v. 87, p. 820-828, 2019.
- LEAL, C. A. G; FIGUEIREDO, H. C. P. Estreptococose clínica em tilápia: passado e presente. 2019. Disponível em: <https://www.panoramadaaquicultura.com.br/estreptococose-clinica-em-tilapia-passado-e-presente>>. Acesso em: 06 de agosto de 2019.
- LEIRA, M. H., et al. Estreptococose nas pisciculturas de Lavras, Suldo Estado de Minas Gerais. *Nutri Time*. v. 13, n. 03, p. 4672 – 4676, 2016.
- LEVY-PEREIRA, N. et al. *In vivo* phagocytosis and hematology in *Astyanax altiparanae*, a potential model for surrogate technology. *Brazilian Journal of Biology*. n. 80, v. 2. 2020.
- LOPES, J. C. O. **Técnico em agropecuária: piscicultura**. Florianópolis: EDUFPI, 2012. 37p.
- LOZAM JUNIOR, R.; TERRILE, A. E.; AGUIAR, C. L. Atividade antimicrobiana da fumaça líquida obtida de *Bambusa* sp. contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. isolados de mastite bovina. *Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 7, n. 1, p. 5-12, 2005.
- MARCUSSO, P. F. et al. Influence of temperature on *Streptococcus agalactiae* infection Nile tilapia. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*. v.52, n.1, p. 57-62, 2015.
- MAZEAUD, M. M. et al. Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. *Transactions of The American Fisheries Society*.v. 106, p. 201 – 212, 1977.
- MIAN, G. F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*. v. 136, p.180 – 183, 2009.

- MILLA, S. et al. Spleen immune status is affected after acute handling stress but not regulated by cortisol in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. **Fish Shellfish Immunology**. v. 28, n. 5(6), p. 931 – 941. 2010.
- MOREIRA, H. L. M. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas:ULBRA, 2001. 199 p.
- MOHAMAD, S. N. et al. Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis* spp.) Broodstock Development Status, Challenges and Prospects for Future Development. **Asian Fisheries Society**. n. 34, p. 73 – 81, 2021.
- MUNIR, M. B. Dietary prebiotics and probiotics influence growth performance, nutrient digestibility and the expression of immune regulatory genes in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. **Aquaculture**, n.460, p. 59- 68, 2016.
- MUNANG'ANDU, H.M.; MUTOLOKI, S.; EVENSEN, O. Prevention and control of viral diseases in aquaculture. **Aquaculture Virology**; Kibenge, F., Godoy, M., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2016.
- MUÑOZ, A. E. P. et al. Aquicultura: atividade em ascensão. **Boletim Ativos da Aquicultura**. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil e Embrapa Pesca e Aquicultura, Brasília, 1ª edição, p.1 – 4, 2015.
- NAKANDAKARE, I. B. et al. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias do Nilo: Parâmetros Hematológicos, Imunológicos e Microbiológicos. **Boletim Instituto do Pesca**. v. 39, n. 2, p. 121-135, 2013.
- NEGRETE, J. C. C. et al. Caracterización de células sanguíneas y parámetros hematológicos em blanquillo *Sorubim cuspidatus*. **Zootecnia Tropical**. v. 27, n. 4, p. 393-405. 2009.
- OLIVEIRA, T. F. et al. Recurrent *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with florfenicol. **Aquaculture**. n.498, p. 51 – 60, 2018.
- ONDEI, V. Você sabia que peixe também toma vacina? **Revista Forbes**. Disponível em: <<https://forbes.com.br/forbesagro/2021/06/voce-sabia-que-peixe-tambem-toma-vacina/>>. Acesso em: 20 de maio de 2022.
- O'NEIL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**. 2016. Disponível em: <<https://amr-review.org/Publications.html>> . Acesso em: 23 de agosto de 2019.
- ORLANDO, T. M. et al. Reproductive performance of female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets with different digestible energy levels. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.46, n. 1, p.1-7. 2017.
- PIRARAT, N. et al. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 113, p. 339-347, 2006.

- RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. Métodos para análises hematológicas em peixes. **EDUEM**. Maringá, Paraná. p. 140, 2013.
- REZENDE, R. A. E. Avaliação de óleos voláteis como antibacterianos administrados na ração destinados à pisciculturas. 2018. 164 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 2018.
- SÁENZ, J.S. et al. (2019): Oral administration of antibiotics increased the potential mobility of bacterial resistance genes in the gut of the fish *Piaractus mesopotamicus*. **Microbiome**, v. 7, n.24, p. 1-14, 2019.
- SERNA, B. C. Efeito de aflatoxinas na ração sobre Matrinxã (*Brycon cephalus*): acúmulo em tecidos e desempenho produtivo. 2018. 101f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo. 2018.
- SCORVO-FRASCÁ, C. M. D.; FILHO, J. D. S. A piscicultura. *Pesquisa & Tecnologia*, vol. 8, n. 2, p. 1-4, 2011.
- Shourbela, R. M., El-Hawarry, W. N., Elfadadny, M. R., Dawood, M. A. O. Oregano essential oil enhanced the growth performance, immunity, and antioxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems. **Aquaculture**. n. 542. p. 2-8. 2021.
- SILVA, R. V. S., et al. Bioproducts from the pyrolysis of castor seed cake: Basic dye adsorption capacity of biochar and antifungal activity of the aqueous phase. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v. 9, n. 1, p. 1 – 14, 2021.
- SINDIRAÇÕES. **Boletim Informativo do Setor**. http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2017/boletim_informativo_do_setor_dez_2017_vs_final_port_sindiracoes.pdf. Acesso em: 20 de agosto de 2019.
- SOUZA, J. L. S., et al. Antimicrobial potential of pyroligneous extract – a systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of Microbiology**. n. 49, p. 128 – 139, 2018.
- SOLCAN, C., et al. The hepatoprotective effect of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries of induced aflatoxin B1 poisoning in chickens. **Poultry Science**. v. 92, n. 4, p. 966-974, 2013.
- SRISAPOOME, P., AREECHON, N. Efficacy of viable *Bacillus pumilus* isolated from farmed fish on immune responses and increased disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Laboratory and on-farm trials. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 67, p.199- 210, 2017.
- SU, Y. L. et al. Development of a quantitative PCR assay for monitoring *Streptococcus agalactiae* colonization and tissue tropism in experimentally infected tilapia. **Journal of Fish Diseases**, n. 39, p. 229–238, 2016.
- TACHIBANA, L. et al. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects on growth performance, gut microbiota modulation and innate immunology. **Aquaculture Research**. p. 1–13, 2020.

- TAKESHITA, N. A. et al. Avaliação da toxicidade aguda de oxitetraciclina para pós-larvas de tilápia do Nilo. **13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**. p. 2 – 11, 2019.
- TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. Hematologia de Peixes Teleósteos. Edição Eletrônica e Arte Final. Ribeirão Preto. SP. 144 p.
- TAVARES-DIAS, M., MORAES, F.R. Características hematológicas da Tilapia rendalli Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturadas em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**. v.19, p. 107-114, 2003.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. **Journal of Fish Biology**. v. 71, n.2, p. 383-388, 2007.
- TESLER, A. G., YOUNG, J. K., BALDWIN, K. M. **Histologia**. Elsevier. Rio de Janeiro – RJ, n. 1. p. 222 – 224. 2008.
- VALLADÃO, G. M. R; GALLANI, S. U; PILARSKI, F. South american fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**. v.10, n. 2, p. 351-368, 2018.
- VAZIRADEH, A., JALALI, A., FARHADI, A. Antibacterial activity of *Oliveira decumbens* against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effects on serum and mucosal immunity and antioxidant status. **Fish & Shellfish Immunology**. v.94. p. 407-416. 2019.
- VERRI, B. Vacinas e peixes resistentes à *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib realmente garantem maior sobrevivência de tilápia-do-Nilo? 2022. 49 f. Dissertação de mestrado (Mestre em ciências) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, São Paulo. 2022.
- XIA, Y. et al. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish immunology**. n. 76, p. 368 – 379, 2018.
- YASUI, G. S. et al. Cultivo monosssexual de tilápias: importância e obtenção por sexagem e inversão sexual. **Cadernos técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**. Belo Horizonte, v. 51, p. 37 – 61, 2006.
- YUKGEHNAISH, K., et al. Gut microbiota metagenomics in aquaculture: Factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. **Reviews in Aquaculture**. p.1–25, 2020.
- YIN, G. et al. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, n. 253, p. 39 – 47, 2005.
- ZANOLO, R., YAMAMURA, M. H. Parasites in tilapia of Nile in freshwater net-tank system. **Semina: Ciências Agrárias**, n. 27, p. 281-288, 2006.
- ZHANG, W. et al. The effective components of herbal medicines used for prevention and control of fish diseases. **Fish and Shellfish Immunology**. n. 126, p. 73 – 83, 2022.