



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE TROPICAL
UNIFAP/ CI-BRASIL/ EMBRAPA –AP/ IEPA



SUZANA CARDOSO RIBEIRO

**POTENCIAL IMUNOESTIMULANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Mentha piperita NA DIETA DO TAMBAQUI, *Colossoma macropomum***

Macapá – AP

2015

SUZANA CARDOSO RIBEIRO

**POTENCIAL IMUNOESTIMULANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita*
NA DIETA DO TAMBAQUI, *Colossoma macropomum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka

Macapá –AP

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

597

R484p Ribeiro, Suzana Cardoso

Potencial imunoestimulante do óleo essencial de *Mentha piperita* na dieta do tambaqui, *Colossoma macropomum* / Suzana Cardoso Ribeiro; orientadora, Eliane Tie Oba Yoshioka. -- Macapá, 2015.

49 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

1. Peixe. 2. Produto natural. 3. Piscicultura. I. Yoshioka, Eliane Tie Oba, orientadora. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

SUZANA CARDOSO RIBEIRO

POTENCIAL IMUNOESTIMULANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* NA
DIETA DO TAMBAQUI, *Colossoma macropomum*

Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amapá

Dr. Marcos Tavares Dias

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amapá

Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes

Universidade Federal do Amapá - UNIFAP

Aprovada em 27 de abril de 2015, Macapá, AP, Brasil.

Dedico à Deus, pela força de todos os dias e pela paciência para suportar as dificuldades sem perder a esperança;

Aos meus pais, Maria do Socorro & Dr. Haroldo Ribeiro, pela oportunidade da vida, pelo amor e orientação na escolha de caminhos que me fazem feliz.

Ao meu filho, João Gabriel, por me inspirar na busca de dias melhores.

AGRADECIMENTOS

À pesquisadora e professora, Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka, pela orientação, pela paciência e pela posição sempre inclinada para o passar de conhecimento científico e sabedoria de vida;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amapá), pela oportunidade de aprendizado com o desenvolvimento desta pesquisa;

À Embrapa e FAPEAP pelo apoio financeiro e logístico;

Aos estagiários do laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos da Embrapa Amapá: Andreza da Silva Cunha, Antonielson Silva Castelo, Bruna Marjara Picanço da Silva, Luiz Carlos Dias Viana e Yago Alves Esteves, pela ajuda e momentos de risos;

À Profa. Dra. Helena Cristina da Silva Assis e colaboradores, pela concessão de uso do Laboratório de Toxicologia Ambiental da Universidade Federal do Paraná (UFPR);

Aos colegas da turma PPGBIO 2013, pela força mutua frente às dificuldades na busca pela qualificação, Alinny Lima, Dayna Malheiros, Carlos Abreu, Maisa Otake, Tiago Costa e Zenaide Miranda;

Aos colegas de trabalho do IMAP, pelo apoio e suporte na minha busca por mais conhecimento;

À minha família, em especial, a parte que se encontra no Amapá, minha irmã Heloisa Ribeiro e à segunda mãe do meu filho, Valdirene Oliveira.

GRATA.

PREFÁCIO

Este trabalho possui um capítulo (artigo), seguindo o formato alternativo proposto pela colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO). Foram adotadas normas para as referências segundo padronização do periódico *Ecology*, somente até as referências da introdução geral. O artigo intitulado **“Óleo essencial de *Mentha piperita* na dieta de tambaquis *Colossoma macropomum* desafiados com *Aeromonashydrophila*: desempenho e resposta hematológica”** seguiu as normas do periódico *Acta Amazônica*, para o qual foi previamente submetido (Anexo).

RESUMO

Ribeiro, Suzana. Potencial imunoestimulante do óleo essencial de *Mentha piperita* na dieta do tambaqui, *Colossoma macropomum*. Macapá, 2015. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

A ocorrência de doenças nos animais em pisciculturas tem aumentado a procura por ações preventivas, tais como o uso de vacinas e de dietas suplementadas com sustâncias estimuladoras do sistema imune. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial imunoestimulante do óleo essencial de *Mentha piperita* para tambaquis (*Colossoma macropomum*). Os animais foram divididos em 12 tanques de 500L (20 peixes/tanque) e submetidos aos tratamentos com três repetições de inclusão do óleo essencial: 0; 0,5; 1,0; 1,5%, oferecido duas vezes ao dia (9 e 16 h). Após trinta dias, cinco peixes de cada tratamento foram anestesiados com benzocaína (0,1 g/L) para coleta de amostras de sangue para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, caracterizando período anterior ao desafio bacteriano. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos tambaquis avaliados foram: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), concentrações plasmáticas de glicose, proteína, triglicérides, albumina, ureia e colesterol. Após análise inicial, os peixes de cada tratamento foram inoculados com bactéria *Aeromonashydrophilla* contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e, após sete dias do desafio bacteriano, parâmetros hematológicos e bioquímicos foram avaliados em três peixes de cada repetição. Os resultados mostraram que a inclusão do óleo de *M. piperita* não influenciou os parâmetros produtivos; não houve mortalidade dos peixes em todo o período experimental. A concentração de Hb aumentou ($P < 0,05$) nos animais alimentados com 0,5% e 1,5% de óleo; após o desafio, ocorreu diminuição nos peixes alimentados com 1,5%. O VCM manteve-se inalterado com o uso do óleo na dieta, entretanto após o desafio apresentou diminuição quando alimentado com 1,0% do óleo na dieta. O CHCM reduziu significativamente após o desafio nos grupos 0% e 1,5%. Os níveis plasmáticos de proteína aumentaram nos grupos 0 e 1,5% após o desafio bacteriano. A albumina aumentou ($P < 0,05$) após o desafio em 0 e 1,0%. Os níveis de colesterol aumentaram com o uso do óleo na dieta e, após o desafio, apenas no grupo controle. Os níveis de triglicérides foram menores no grupo alimentado com 0,5% de óleo na dieta; e, após o desafio, em 0, 0,5 e 1,5% observou-se aumento significativo deste metabólito. Conclui-se que o óleo essencial de *M. piperita* na alimentação em até 1,0% apresenta efeito sobre as respostas fisiológicas do tambaqui, recomendando-se seu uso como imunoestimulante.

Palavras-chave: Peixes; produto natural; piscicultura.

ABSTRACT

Ribeiro, Suzana. Immunostimulant potential of *Mentha piperita* essential oil on tambaqui, *Colossoma macropomum* diet. Macapá, 2015. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

Animal diseases in fish farms has increased the demand for preventive measures, such as vaccines and supplemented diets with immunostimulatory substances. This study aimed to evaluate the immunostimulatory potential of the essential oil of *Mentha piperita* for tambaqui (*Colossoma macropomum*). The animals were divided into 12 tanks of 500L (20 fish / tank) and submitted to treatments with three replications of 0; 0.5; 1.0; 1.5% oil inclusion levels, twice a day (9 and 16h). After thirty days, five fish from each treatment were anesthetized with benzocaine (0.1 g/L) for blood collection and evaluation of hematological and biochemical parameters, characterizing the period before the bacterial challenge. Blood parameters evaluated were: erythrocytes count, hematocrit, hemoglobin concentration, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration; glucose, protein, triglycerides, albumin, urea and cholesterolplasma concentrations. These were determined after 30 days of feed and 7 days after challenge with *Aeromonashydrophilla* containing 1.5×10^8 CFU / mL. The results showed that the inclusion of *M. piperita* oil in the diets did not affect the production parameters and the fish survival. The Hb concentration increased ($P < 0.05$) in animals fed with diets with 0.5 and 1.5% of essential oil; after challenge, Hb fell significantly in the 1.5% group. The tambaqui's mean corpuscular volume (MCV) remained the same with the oil in the diet, however after challenge decreased in the group fed by 1.0%. Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) diminished at 0% and 1.5% after challenge. Protein levels increased ($P < 0.05$) in levels 0 and 1.5% after challenge. Albumin concentration showed increase ($P < 0.05$) after challenge for 0 and 1.0% of oil in the diets. Increased cholesterol levels presented significantly increases with the oil in the diet; and after challenge, just the control group remained increased. Triglycerides levels were lower in fish fed by diets with 0.5% of oil; and after challenge, showed increased levels at 0, 0.5 and 1.5%. The essential oil of *M. piperita* up to 1.0% of inclusion in the diets, promoted tambaqui's physiological responses, and could be recommended as immunostimulant product.

Keywords: Fish; natural product; fish farm.

ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Exemplar de tambaqui (*Colossoma macropomum*) 15

ABREVIATURAS E SIGLAS

Hematócrito (Ht)

Concentração de hemoglobina (Hb)

Eritrócitos (Eri)

Volume corpuscular médio (VCM)

Hemoglobina corpuscular média (HCM)

Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	15
1.2 Nutrição e Saúde dos peixes	16
1.3 Imunoestimulantes.....	17
1.4 <i>Mentha piperita</i>	18
1.5 Hematologia e Imunologia de peixes.....	19
2. PROBLEMA.....	21
3. HIPÓTESES.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. OBJETIVO GERAL	23
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5. REFERÊNCIAS.....	24
6. ARTIGO	31
7. CONCLUSÕES	49

1. INTRODUÇÃO GERAL

Aquicultura é definida como o cultivo de organismos aquáticos com interesse comercial. Esta atividade tem uma longa história, tendo começado na China há mais 4.000 anos. Considera-se muito importante economicamente, pois destina-se à produção de alimentos com alto teor protéico, essencial ao desenvolvimento do homem (Camargo e Pouey, 2005). A contribuição da aquicultura, representado pela somatória dos diversos organismos aquáticos, continua crescendo, saltando da significância de 3,9% em 1970 para 32,4% em 2004 (FAO, 2006), representando cerca de um milhão de toneladas e 59,4 milhões de toneladas, respectivamente. O setor aquícola vem apresentando taxa de crescimento de 8,8% há várias décadas, enquanto a pesca contribui com apenas 1,2%, e a pecuária com 2,8% (FAO, 2008).

No Brasil, de acordo com o relatório do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2010), a aquicultura apresentou uma produção em 2011 de 628.704,3 t. Existem planos para dobrar esse número até 2015. Esta produção no Brasil é considerada baixa, apesar de o país ter grande variabilidade espacial da disponibilidade de água (Leal, 1998), com cerca de 20% da água doce mundial (Bizerril e Primo, 2001), e espaço para a implementação de novos projetos de pesca. Pavanelli et al. (2008) afirmam que o Brasil está inserido no contexto internacional como um país com grande potencial para a piscicultura, devido ao vasto território eo clima tanto para espécies de regiões tropicais ou temperadas, que favorece o cultivo de espécies de peixes de água doce.

O cultivo intensivo é mais utilizado, mesmo apresentando como consequência problemas nutricionais, alteração na qualidade da água e estresse crônico nos peixes, causado pelo confinamento, situação que pode facilitar a transmissão de patógenos (Schwedler e Johnson, 2000; Martins, 2004). Doenças infecciosas e parasitárias causam graves problemas para a saúde dos peixes e grandes prejuízos econômicos para os piscicultores. Os valores exatos das perdas econômicas causadas por esses agentes em cultivos de peixes no Brasil não são conhecidos (Zimmermann et al. 2004). Atualmente, surtos de doenças parasitárias e bacterianas estão entre os fatores limitantes para a piscicultura (Kubitza 1999, Eiras et al. 2010). Com isso os produtores têm lançado mão de massivas quantidades de antimicrobianos e desinfetantes para controlar mortalidades dos peixes e evitar grandes perdas econômicas. A terapêutica de doenças em peixes é vista com criticismo, devido aos efeitos colaterais dos produtos

disponíveis para uso nos dias de hoje, além do uso indiscriminado de produtos químicos no controle e prevenção de problemas sanitários estarem cada vez mais evidentes com o aumento da incidência de doenças em peixes cultivados. O ideal seria que o produto a ser utilizado na aquicultura apresentasse as seguintes características: degradação rápida; não deixar resíduo na água, no substrato ou no tecido do animal tratado; não influenciar a qualidade da água; não oferecer perigo ao homem e animais; baixo custo e fácil aplicação (Maximiano et al. 2005, Mourino et al. 2012)

Diversas plantas medicinais estão sendo utilizadas pelo homem há milhares de anos e continuam tendo o seu valor não apenas nas comunidades tradicionais como também são objeto de estudos interdisciplinares na busca de novos fármacos (Macedo et al. 2002). O uso de fitoterápicos na produção animal tem se mostrado promissor por serem produtos naturais, biodegradáveis e com atividade antimicrobiana contra diversos patógenos (Olivo et al. 2007). *Mentha piperita*, conhecida popularmente como menta, hortelã e hortelã-pimenta, trata-se de uma erva aromática de haste ramosa e quadrangular, verde ou roxo-purpúrea, juntamente com os ramos. Seu cultivo é difundido em todas as regiões do Brasil, apresentando em elevado grau propriedades antiespasmódicas, carminativas, estomáticas, estimulantes e tônica (Amelunxen, 1967, Braga, 1983, Ramos et al., 1996, Adam, 1998).

Estudos com óleo essencial de *M. piperita* mostraram o uso in vitro e in vivo contra patógenos em peixe (Maciel, 2002). Em seus estudos, Trajano et al. (2009) obtiveram resultados positivos do óleo de *M. piperita* na atividade inibitória do crescimento bacteriano, sendo muitos desafios feitos com *A. hydrophila*, considerada uma zoonose, uma vez que pode contaminar água e alimentos e provocar enfermidades no homem, tais como febre, dor abdominal, vômitos, diarreia, meningite, endocardite, septicemia, inflamações diversas entre outros (Janda e Abbott, 1998, Vivas et al. 2000). No entanto, investigações científicas efetivas, com métodos terapêuticos não convencionais, usando-se fitoterápicos, ainda são escassas (Horegen et al. 2003), mostrando assim a importância e a necessidade da realização de mais estudos.

1.1 Tambaqui

O tambaqui *Colossomamacropomum* (Cuvier, 1818) é uma espécie de peixe da classe Osteichthyes, subclasse Actinopterygii, ordem Characiformes, família Serrasalmidae e subfamília Serrasalminae. Também chamado de pacuvermelho, é um peixe de escamas com corpo romboidal, nadadeira adiposa curta com raios na extremidade; dentes molariformes e rastros branquiais longos e numerosos, boca prognata pequena e forte com dentes molariformes. A coloração, geralmente, é parda na metade superior e preta na metade inferior do corpo, mas pode variar para mais clara ou mais escura dependendo da cor da água (Dairiki, 2011).



Figura 01. Espécime de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Originária da América do Sul, das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, é uma espécie considerada como o segundo maior peixe de água doce de escamas da América do Sul, atrás apenas do pirarucu *Arapaima gigas* (Chagas e Val, 2003, Santos et al. 2006, FishBase, 2010). Os peixes da bacia amazônica são submetidos a drásticas variações sazonais nas condições dos ambientes aquáticos. Nos momentos de cheia que ocorre a frutificação de grande número de espécies de árvores da várzea, que com a ajuda da água, podem ter suas sementes dispersas para outros locais (Kubitzki e Ziburski, 1994). Esses frutos e sementes são fontes energéticas importantes para a alimentação de peixes (Goulding, 1980, Waldhoff et al. 1996), incluindo espécies de grande valor comercial, como o tambaqui *C. macropomum* (Araújo-Lima e Goulding, 1998). Na estação de estiagem, os peixes são principalmente herbívoros, mas podem se alimentar de insetos, caracóis, outros peixes e frutos da época. No período das cheias, o material gorduroso localizado na cavidade abdominal, acumulado ao redor das vísceras pode ser utilizado como reserva de energia (Castelo, 1980).

Do ponto de vista econômico esta espécie é importante como alimento de alta qualidade na América do Sul (Izel et al. 2004). É uma espécie nativa que apresenta bom

desempenho em criação intensiva, sendo a mais cultivada na Região Norte do Brasil (Chellapa et al. 1995, Val et al. 2000, Tavares-Dias, 2011). É facilmente adaptável ao cativeiro, com boa alimentação, conversão, disponibilidade de juvenis, crescimento rápido e manejo fácil, (Goulding, 1980, Goulding e Carvalho, 1982, Goulding, 1993, Araújo-Lima e Goulding, 1998).

1.2. Nutrição e saúde dos peixes

Peixes são animais pecilotérmicos, com dependência direta e indireta do ambiente, portanto mais afetados pelas variações das condições ambientais que animais terrestres (Cyrino et al. 2010). O atendimento das exigências nutricionais é essencial para o adequado crescimento e desenvolvimento dos peixes, mas a maioria das pesquisas em nutrição avalia as exigências e a utilização de alimentos com base no desempenho produtivo e sinais de deficiência, sem considerar a capacidade de resistência dos animais, quando expostos a patógenos ou agentes estressores (Santos, 2013).

Segundo Chagas (2010), na nutrição de peixes, benefícios no crescimento, eficiência alimentar e sobrevivência foram alcançados em várias espécies cultivadas com estabelecimento de suas exigências nutricionais, mas hoje as pesquisas consideram também tais efeitos sobre a saúde dos peixes. Evidências científicas dos últimos 30 anos indicam que os nutrientes da dieta, bem como aditivos podem estimular o sistema imunológico dos peixes e que as rações devem ser formuladas não somente com critérios nutricionais, mas também considerando a capacidade de promover a saúde (Kiron, 2012). Neste contexto, um novo conceito de balanceamento de rações vem se estabelecendo, com princípios baseados em nutrição, saúde e responsabilidade ambiental, com intuito de promover estratégias que possam amenizar os efeitos do estresse e aumentar a resistência imunológica dos peixes, permitindo que o mesmo mantenha o equilíbrio orgânico (Falcon, 2007). Dentre as estratégias nutricionais utilizadas com o intuito de favorecer a saúde dos peixes estão os alimentos funcionais considerados como alimento ou constituinte alimentar com benefícios na promoção da saúde e prevenção de doença, independentes da função de nutriente essencial (Day et al. 2009). Como alimento funcional podemos citar os imunoestimulantes, considerados aditivos de uso zootécnico com capacidade reconhecida de modular o

sistema imunológico, amenizar o estresse e proteger os animais contra infecção por patógenos (European Food Safety Authority, 2008).

1.3. Imunoestimulantes

Aquicultura no Brasil tem apresentado um crescimento enorme nos últimos anos devido aos métodos de cultura intensivo. Estes procedimentos intensivos levaram a surtos de doenças, bem como ao uso indevido de antibióticos. Uma alternativa viável para evitar o uso de produtos químicos e perdas econômicas é a administração de imunoestimulantes, que aumenta a resposta imunológica não específicos peixes e têm uma atividade de largo espectro, que parece ser útil no controle de doenças de peixes. Portanto, pode ser alternativa profilática como agentes terapêuticos na piscicultura (Biller-Takahashi et al. 2004, Nya e Austin, 2009a,b, Talpur e Ikhwanuddin, 2012, 2013a,b.).

O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa contra patógenos em peixes, sendo constituída por compostos: macrófagos, monócitos, granulócitos e elementos humorais, como a lisozima (Narnawareet al. 1994, Punitha et al. 2008). Segundo Sakai (1999) os benefícios dos imunoestimulantes é o aumento da atividade de macrófagos, fagocitose por neutrófilos e monócitos, maior produção de linfócitos como também de imunoglobulina e lisozima. Entre compostos com características imunoestimulantes temos: vitaminas, minerais, proteínas, aminoácidos, hormônios, substâncias derivadas de plantas e animais, prebióticos e probióticos com propriedade antioxidante, antimicrobiana, anticarcinogênica, analgésica, inseticida, antiparasitária, promotora de crescimento e de apetite, hepatoprotetora, entre outras (Razaliet al. 2008, Cristea et al. 2012, Rodrigues et al. 2013). Os imunoestimulantes são considerados substâncias biológicas que auxiliam beneficamente os mecanismos específicos imunológicos e não específicos dos animais (Viadanna, 2012), indicando que administração profilática de imunoestimulantes na aquicultura é promissora no fortalecimento do sistema imune dos animais cultivados (Anderson, 1992, Punitha et al. 2008, Citarasu, 2010, Harikrishnan et al. 2010a,b).

1.4. *Mentha piperita* Linnaeus 1753 (Laminaceae)

O uso de plantas no tratamento e profilaxia de enfermidades estão antigo quanto a espécie humana. Nos dias atuais a utilização de plantas medicinais tem promovido estudos visando resolver problemas de ordem político-econômica promovendo o cultivo oficial e não somente exploratório de tais espécies(Basso et al. 1998, Maciel, 2002).

O gênero *Mentha* ocupa posição de destaque na economia mundial entre as plantas produtoras de óleos essenciais (Harris, 2006). Os mais importantes constituintes desses óleos são: mentol, mentana, mentofurano, acetato de mentila e pulegona (Aflatuni, 2005, McKay e Blumberg, 2006). A composição qualitativa e quantitativa desses monoterpenóides determina a qualidade e o valor comercial do óleo essencial. Óleo de menta de altaqualidade consiste, predominantemente, de mentol (30-55%); seguido de moderada proporção de seu precursor, mentona (14-32%); e de baixos teores de pulegona (<4%), mentofurano (1-9%) e acetato de mentila (2,8-10%) (Valmorbida et al. 2006, Behn et al. 2010).

Mentha piperita, conhecida também como hortelã-pimenta (Munsi, 1992 apud Simões e Spitzer, 2000). Trata-se de um híbrido, originário do cruzamento entre diversas espécies, provavelmente *Menthaspicata* L., *M. aquatica* L., *M. longifolia* Huds. e *M. rotundifolia* Huds (Maffei et al. 1999). Junto com a *M. arvensis* L., é a espécie de maior interesse econômico na obtenção de óleos essenciais. O óleo, amplamente empregado como flavorizante, aditivo em alimentos, em produtos de higiene bucal e em preparações farmacêuticas, no tratamento de problemas respiratórios e gastrintestinais, apresenta ações antimicrobiana e espasmolítica, facilita a digestão e é responsável pela eliminação de gases do aparelho digestivo (Simões e Spitzer, 2000). As plantas da família Lamiaceae, pela riqueza em óleos essenciais, têm sido amplamente investigadas sob o ponto de vista agronômico e químico, não somente com o intuito de maximizar o conteúdo de óleo essencial, mas também buscando avaliar a variação dos constituintes importantes destes óleos (Martins, 1998).

A cultivo da menta iniciou-se no Estado de São Paulo no começo do século XX. O Brasil foi o maior produtor do mundo desde a II Guerra Mundial até a década de 70, sendo o Estado do Paraná responsável por 95% da produção (Paraná, 1976). A demanda de mentol atualmente ultrapassa 7.000 t por ano, movimentando aproximadamente 300 milhões de dólares anualmente (Patel et al. 2007), sendo os Estados Unidos o maior produtor (Tavish e Harris, 2002).

Muitas plantas são conhecidas por suas propriedades medicinais, porém existem poucos estudos sobre sua eficácia em promover a saúde dos peixes. Os óleos essenciais de plantas (mistura complexa de diferentes compostos aromáticos) estão entre os principais compostos naturais a serem testados em peixes, pela vasta atividade antimicrobiana já descrita de seus componentes (Lang e Buchbauer, 2012). Além disso, são biodegradáveis e devido seus multicomponentes naturais são menos propensos a causar o desenvolvimento de resistência bacteriana (Kulkarni et al. 2013).

De acordo com Astaneh et al. (2010), o óleo essencial de *M. piperita* é bactericida para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus faecali*, além de agir como antioxidante natural, pelas suas moléculas bioativas neutralizarem radicais livres e retardarem o progresso de muitas doenças crônicas associadas ao estresse oxidativo e a espécies reativas de oxigênio (EROS). Assim, desafios específicos com agentes bacterianos podem indicar o efeito do uso da suplementação da dieta com fitoquímicos provenientes de plantas medicinais (Anderson e Jeney, 1992, Citarasu, 2010, Harikrishnan et al. 2010a,b).

1.5. Hematologia e Imunologia de peixes

A hematologia é o estudo do sangue e a sua aplicação em pesquisa animal e em processo de doença no homem é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos (Ranzani-Paiva et al. 2013). Na intensificação da piscicultura e consequentes problemas com a saúde dos animais no ambiente de criação, a hematologia pode ser utilizada como ferramenta para obtenção de respostas na avaliação das condições de defesa orgânica dos peixes (Hrubec et al. 2001). Alterações fisiológicas dos peixes são refletidas na composição sanguínea, modificando os parâmetros bioquímicos e hematológicos (Hrubec et al. 1997). Assim, a análise sanguínea pode revelar disfunções agudas e crônicas, atribuíveis à nutrição, qualidade da água, presença de toxinas e doenças, entre outros fatores (Hrubec et al. 2001).

Com este propósito, vários pesquisadores têm utilizado a hematologia clínica como método de avaliação das exigências nutricionais e respostas imunológicas, tais como exigências de minerais para tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* (Barros et al. 2002, Ferrari et al. 2004, Hisano et al. 2004), e vitaminas para pirarucu *Arapaima gigas* (Andrade et al. 2007) e matrinxã *Bryconamazonicus* (Affonso et al. 2007). Além

depeixes parasitados por *Lernaea cyprinacea*(Silva-Souza et al. 2000), *Dolops carvalhoi*(Tavares-Dias et al. 2007a), *Anacanthorus penilabiatus* e *Piscinoodinium pillulare*(Tavares- Dias et al. 2008).

O sangue dos peixes teleósteos é formado por eritrócitos, leucócitos e trombócitos, sendo que a produção estimada de células sanguíneas em peixe de 120 g está na ordem de 1.012 células, e o seu volume corresponde de 1,5 a 3% do peso corporal (Tandon e Joshi, 1976), maior taxa de hemoglobina, porém menor volume (Lay e Baldwin, 1999). Nesses peixes é alta a demanda por oxigênio para o metabolismo (Rambhaskar E Srinivasa-Rao, 1987).

Os eritrócitos são as células sanguíneas mais numerosas, sendo ovais com citoplasma eosinofílico não granular e núcleo oval e basofílico (Tocidlowskiet al. 1997). Essas células contêm hemoglobina, que é a proteína conjugada, composta por globina, e por um núcleo prostético do tipo porfirina, chamado heme, cujo principal componente químico é o ferro, sua função é transportar o oxigênio e parte do gás carbônico no sangue, sendo que qualquer deficiência no eritrócito será traduzida pela falta de oxigênio nos tecidos. O hematócrito é determinado por meio do percentual de eritrócitos em relação ao volume total de sangue. Por meio da obtenção e análise desses valores é possível determinar os índices hematimétricos absolutos, importantes na avaliação e detecção de quadros de anemias (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

2. PROBLEMA

O bom desempenho no cultivo depende do bom manejo na produção de peixes, pois a elevada densidade de animais que pode ser utilizada durante o cultivo, pode facilitar a disseminação de doenças entre os peixes.

Situações de pisciculturas em precárias condições de manejo são comuns no Estado do Amapá com alta probabilidade de aparecimento de doenças nos peixes levando a baixos rendimentos e perdas econômicas. Assim, há necessidade do uso de produtos que possam combater o surgimento de doenças nos peixes por meio da melhora na saúde dos animais sem afetar a qualidade sanitária, o sabor do produto final, o meio ambiente e sem tornar essa medida preventiva uma ação de alto custo.

Assim, os problemas que podem ser apresentados neste estudo são:

A inclusão do óleo essencial de *Mentha piperita* na dieta do tambaqui podem melhorar o desempenho e sistema imunológico do tambaqui?

Quais níveis de inclusão o óleo essencial de *Mentha piperita* apresentam melhores resultados na saúde (fisiologia) do tambaqui?

3. HIPÓTESES

A inclusão do óleo essencial de *Mentha piperita* na dieta do tambaqui pode melhorar seu crescimento e melhor o sistema imune dos animais.

Quanto maior o nível de inclusão do óleo essencial de *Mentha piperita* na dieta, melhor condição de saúde (fisiologia) será apresentada pelo tambaqui.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial imunoestimulante do óleo essencial de *Mentha piperita* e o desempenho e fisiologia do tambaqui, *Colossoma macropomum*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da inclusão de 0, meio (0,5), um (1,0) e um e meio (1,5) do óleo essencial de *Mentha piperita* no desempenho de tambaqui;

Verificar o estado de saúde (fisiologia) do tambaqui após alimentação com as dietas distintas contendo óleo essencial de *Mentha piperitae* após o desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila*.

5. REFERENCIAS

- Adam, K., A. Sivropoulou, S. Kokkini, T. Lanaras, and M. Arsenakis. 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare subsp. Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **46**: 1739-1745.
- Affonso, E.G., E. C. Silva, M. Tavares-Dias, G. C. Menezes, S.S.M Carvalho, E.S.S. Nunes, D. R. Ituassú, R. Roubach, E. A. Ono; J.D.I. Fim, and J. L. Marcon. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. **147**: 383-388.
- Aflatuni, A. 2005. The yield and essential oil content of mint (*Mentha* ssp.) in northern ostrobothnia. Dissertation (Academic) – University of Oulu, Oulu, Finland.50p.
- Amelunxem, F. 1967. Some observations on the leaf cells of *Mentha piperita* L. *Planta Medicinal*, **15**:32-34.
- Andrade, J.I.A., E. A. Ono, G. C. Menezes, E. M. Brasil, R. Roubach, E. C. Urbinati, Tavares-Dias, J. L. Marcon, and E. G. Afonso. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **146**: 576-580.
- Araújo-Lima, C. A. R. M., and M. Goulding.1998. Os Frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Sociedade Civil Mamirauá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – MCT, CNPq, Manaus, Brasil.
- Basso, F., M. Pisante, B. Basso. 1998. Agronomical aspects of officinal plant cultivation. *Phytotherapy Research*. **12**: 131-134.
- Behn, H., A. Albert, F. Marx, G. Noga, and A. Ulbrich. 2010. Ultraviolet-B and photosynthetically active radiation interactively affect yield and pattern of monoterpenes in leaves of peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**:7361-7367.
- Biller-Takahashi, J, D., and C. Elisabeth. 2004. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 86 (3): 75-87.
- Bizerril C.R.S.F., and P.B.S. Primo. 2001. Peixes de águas Interiores do Estado do Rio de Janeiro. Fundação de Estudos do Mar, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Braga, R. 1983. *Plantas do Nordeste-Especialmente do Ceará*. Editora Universitária da UFRN. Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

- Camargo S.G.O., and J.L.O.F. Pouey. 2005. Aquicultura, um mercado em expansão. Revta Bras. Agrociência. **11**:393-396
- Castelo, F. P., D. B. Rodriguez-Amaya, and F. C. Strong. 1980. Aproveitamento e características da gordura cavitária do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818). Acta Amazônica **10**:557–576.
- Chagas, E.C., and A.L. Val. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- Chagas, E.D. 2010. β -glucano e nucleotídeos para tambaquis (*Colossoma macropomum*) vacinados e desafiados com *Aeromonas hydrophila*: Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrarias e Veterinária.
- Chellappa, S., N. T. Chellappa, W. B. Barbosa, F.A. Huntingford, and M. C. M Beveridge. 1995. Growth and production of the Amazonian tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. Aquaculture International, **3**: 11-21.
- Cristea, V., A. Antache, I. Grecu, A. Docan, L. Dediu, and M. Mocanu. 2012. The use of phytobiotics in aquaculture. Lucrări Științifice – Seria Zootehnie. **57**: 250-255.
- Cyrino, J. E. P., A. J. A. Bicudo, R. Y. Sado, R. Borghesi, and J.K. Dairiki. 2000. A piscicultura e o ambiente – uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. Revista Brasileira de Zootecnia. **39**: 69-87.
- Dairiki, J. K., and T.D. Silva, 2011. Revisão de literatura: exigências nutricionais do tambaqui compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brasil.
- Day, G., 2009. Safety evaluation of a high-lipid algal biomass from *Chlorella protothecoides*. Regulatory Toxicology and Pharmacology. **55**:166–180.
- Eiras J.C., R.M Takemoto, and G.C Pavanello. 2010. *Diversidade dos Parasitos de Peixes de Água Doce do Brasil*. Editora Clichetec, Maringá.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2008. Scientific opinion of the panel on additives and products or substances used in animal feed on functional groups of additives as described in Annex 1 of Regulation (EC) No 1831/2003. EFSA J., 1–19, 920.
- Falcon, D.R. 2007. Nível de suplementação de 1,3 β -glucano e vitamina C em dietas para tilápia-do-Nilo: desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos. Tese (Doutorado) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. “The State of World Fisheries and Aquaculture”.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. Fisheries and Aquaculture Department. Statistics.
- Garavello, J.C, and H.A. Britski. 1990. (Osteichthyes, Anastomidae). Revista Brasileira de Biologia. **60**: 217-220.
- Goulding, M., and M.L. Carvalho. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. Revista Brasileira de Zoologia. **1**: 07-133.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., and M.S Heo. 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology. **28**: 354-361.
- Harikrishnan, R., M. Nisha Rani., and C. Balasundaram. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. **221**: 41-50.
- Harris, B. 2006. Menthol a review of its thermoreceptor interactions and their therapeutic applications. International Journal of Aromatherapy. **16**:117-131.
- Hisano, H., L.E. Pezzato, M.M. Barros, E.S. Freire, G.S. Gonçalves, and J.E.C. Ferrari. 2004. Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Acta Scientiarum Animal Sciences. **26**: 171-179.
- Hordegen, P., H, Hertzberg, J, Heilmann, W, Langhans, and V, Maurer. 2003. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. Veterinary Parasitology. **117**: 51 – 60.
- Hrubec, T.C., J.L. Robertson, and S.A. Smith. 1997. Effects of temperature on hematologic and serum biochemical profiles of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*). American Journal Veterinary Research. **58**:126-130.
- Hrubec, T.C., S.A. Smith, and J.L. Robertson. 2001. Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of Hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*). Veterinary Clinical Pathology. **30**: 8-15.
- Izel, A.C.U., and L.A.S. Melo. 2004. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques escavados no estado do Amazonas. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brasil.

- Janda, J. M., and S. J. Abbott. 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases*. **27**: 332-344.
- Kiron, V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*. **173**: 111– 133.
- Kubitza, F. 1999. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. Degaspari. Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- Kubitzki, K., and A. Ziburski. 1994. Seed dispersal in flood plain forest of Amazonia. *Biotropica*. **26**: 30 - 4
- Kulkarni R.R., P.V. Pawar, M.P. Joseph, R.A. Akulwar, A. Sen, and S. P. Joshi. 2013. *Lavandulagibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect controlactivities against *Aedes aegypti*, *Anopheles sfittephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal Pesticide Science*. **86**: 713-718.
- Lang, G., and G. Buchbauer. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Flavour and Fragrances*. **27**: 13–39.
- Lay, P.A., and J. Baldwin. 1999. What determines the size of teleost erythrocytes? Correlations with oxygen transport and nuclear volume. *Fish Physiology and Biochemistry*. **20**: 31-35.
- Macedo, M., J.M.K. Carvalho, and F.L. Nogueira. 2002. Plantas medicinais e ornamentais da área de aproveitamento múltiplo de Manso, Chapada dos Guimarães, Mato Grosso. UFMT. Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.
- Maciel, M. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*. **25**: 429-438.
- Maffei, M., D. Canova, C.M. Berte, and S. Scannerini. 1999. UV-A effects on photomorphogenesis and essential oil composition in *Mentha piperita*. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. **52**:105-110.
- Martins, E.R. 1998. Estudos em *Ocimum selloi* Benth.: isoenzimas, morfologia e óleo essencial. Page 222-246 in: L. C. MING. Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agronômica. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, São Paulo, Brasil.
- Martins, M. L. 2004. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. Sanidade de Organismos aquáticos. Editora Livraria Varela, São Paulo, São Paulo, Brasil.

- Mckay, D.L., and J.B. Blumberg. 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research.* **20**:619-633.
- MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura), 2012. MPA Lança Boletim Estatístico da Pesca e da Aquicultura com os dados de 2010. Panorama da Aquicultura, janeiro, fevereiro.
- Narnaware, Y.K., H.N. Baker, and M. G. Tomlinson. 1994. The effect of various stress, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry.* **13**: 31-34.
- Nya, E.J., and Austin, B. 2009. Use of garlic, *Allium sativum* to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases.* **617**: 963 -970.
- Nya, E.J., Austin, B., 2009b. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases.* **32**: 971– 977.
- Olivo, C. J., L. T. Pereira, N. M. Carvalho, F. F. Vogel, B. M. Heinzmann, and A.P. Neves. 2007. Uso da bananeira (*Musa* spp.) no controle de parasitas de animais domésticos: do empirismo à ciência. *Livestock Research for Rural Development.*
- Paraná. 1976. Secretaria de Estado da Agricultura – Departamento de Economia Rural. Aspectos da cultura da Menta no Paraná. Curitiba, Paraná, Brasil.
- Patel, T., Y. Ishiuji, and G. Yosipovitch. 2007. Menthol: Are freshing look at this ancient compound. *Journal of the American Academy of Dermatology.* **57**: 873-8.
- Pavanelli, G.C., J.C Eiras, and R. M. Takemoto. 2008. Doenças de Peixes. Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento. Universidade Estadual de Maringá. **3**: 113.
- Rambhaskar, B., and K. Srinivasa-Rao. 1987. Comparative haematology of the species of marine fish from Visakhapatnam coast. *Journal of Fish Biology.* **30**: 59-66.
- Ramos, R. A., R. A. De La Torre, N. Alonso, A. Villaescusa, J. Betancourt, and A. J. Vizoso. 1997. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *J. Ethnopharmacol.* **52**:123-127.
- Ranzani-Paiva, M.J., and A. T. Silva-Souza. 2004. Hematologia de peixes brasileiros. Pages 89 – 120 *In:* Sanidade de organismos aquáticos. Varela, Eds. Campinas, São Paulo, Brasil.
- Ranzani-Paiva, M.J., S.B Pádua, M. Tavares-Dias, and M. Egami. 2013. Métodos para analise hematológica em peixes. Maringá, Paraná, Brasil.

- Rodrigues, A. P. O. 2003. Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos. Embrapa. Brasília, DF, Brasil.
- Sakai, M. 1999. Current research status immunoestimulants. *Aquaculture*. **172**: 63 – 92.
- Santos, V. G. 2013. Própolis bruta em dieta para Tilápia-do-nilo e ação antimicrobiana frente à *Aeromonas hydrophila*. Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária. Botucatu, São Paulo, Brasil.
- Schwedler T.E., and S.K. Johnson. 1999/2000. Responsible care and health maintenance of fish in commercial aquaculture. *Animal Welfare Inf. Cent.* **10**: 3-4.
- Silva-Souza, A.T., S.C. Almeida, and P.M. Machado. 2000. Effect of the infestation by *Lernaea cyprinacea* Lennaeus, 1758 (Copepoda, Lernaeidae) on the leucocytes of *Schizodon intermedius*. *Revista Brasileira de Biologia*. **60**: 217-220.
- Simões, C. M. O., and V. Spitzer 2000. Óleos voláteis. Pages 394-412 *In* C. M.O Simões. Farmacognosia da planta ao medicamento. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Universidade Federal de Santa Catarina. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M. 2013a. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. **411**: 46 –52.
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture* **364**: 6-12.
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M. 2013b. *Azadirachta indica* (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian sea bass, *Lates calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish and Shellfish Immunology*. **34**: 254–264.
- Tandon, R.S., and B. D. Josh. 1976. Total red and white blood cell count of 33 species of freshwater teleosts Z. *Tierphysiology. Tierernahrg. Futtermittelkde.* **37**: 293-297.
- Tavares-Dias, M., and Moraes, F.R. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- Tavares-Dias, M., F. R. Moraes, and M. L. Martins. 2008. Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in free fishing from Franca, São Paulo, Brazil. *Bol. Inst. Pesca* **34**:189-196.

- Tavares-Dias, M., F.R. Moraes, E. M. Onaka, and P.C.B. Rezende. 2007a. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. *Veterinarski Arhiv* **77**: 355-363.
- Tavish, H.M., and D. Harris. 2002. Economic study of essential oil production in the UK: a case study comparing non-UK lavander/ lavandin production and peppermint/spearmint production with UK production techniques and costs. For the Government Industry, Forum for Non. Food Crops.
- Tocidlowski, M.E., G.A. Lewbart, and M.K. Toskopf. 1997. Hematological study of Red pacu (*Colossoma brachypomum*). *Veterinary Clinical Pathology* **26**: 119-125.
- Trajano, V. N., E. D. O. Lima, E. L. D. Souza, and A. E. R. Travassos. 2009. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **29**: 542-545.
- Val, A.L., and L. F. Lemos. 2000. Situação atual da aquicultura na região Norte. In: Valenti, W.C. Aquicultura no Brasil. Brasília: CNPq **7**: 247-266
- Valmorbida, J, C.F.S. Boaro, M. O. M, Marques, and A.F. Ferri, .2006. Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **8**: 56-61.
- Viadanna, P. H. O. 2012. Uso de imunoestimulante *Saccharomyces cerevesiae* em peixes da espécie *Cyprinus carpio*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Vidal F., J.C. Vidal, A.P.R. Gadelha, C.S. Lopes, M.G.P. Coelho, and L.H. Monteiro-Leal. 2007. *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha* x *piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Experimental Parasitology*. **115**: 25-31.
- Vivas, J., A. I. Tinaja, L. Barbeyto, L. A. Rodrigues. 2000. Identification of motile *Aeromonas* strains with the Micro Scan Walk-Away system in conjunction with Combo Negative Type 1s panels. *Applied Environmental Microbiology*. **66**:1764-1766.
- Waldhoff, D., U. Saint-Paul, and B. Furch. 1996. Value of fruits and seeds from the floodplain forests of central Amazonia as food resource for fish. *Ecotropica*, **2**:143-156.
- Zimmermann, S., and K. Fitzsimmons. 2004. Tilapicultura Intensiva. Pages 249-254 *In* Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., D.M. Fracalossi, and I.N. Castagnoli. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical Intensiva. Ed. São Paulo, São Paulo, Brasil.

Óleo essencial de *Mentha piperita* na dieta de tambaquis *Collossoma macropomum* desafiados com *Aeromonas hydrophila*: desempenho e resposta hematológica

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos imunoestimulantes do óleo essencial de *Mentha piperita* na dieta de tambaqui *Collossoma macropomum* após desafio com *Aeromonas hydrophila*. Os peixes foram alimentados com dietas contendo 0; 0,5; 1,0; 1,5% do óleo por kg de ração comercial para peixesonívoros, duas vezes ao dia, durante 30 dias. Para o desafio, os peixes foram inoculados intraperitonealmente com $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Parâmetros hematológicos e bioquímicos dos tambaquis foram determinados após 30 dias de alimentação e sete dias do desafio. Não houve mortalidade dos peixes durante o experimento de alimentação. O óleo na dieta não influenciou nos parâmetros produtivos dos peixes. Com a alimentação observou-se aumento da Hb em peixes alimentados com dietas com 0,5 e 1,5%; da albumina em 1,0% de *M. piperita*; do colesterol em todos os grupos; e triglicérides naqueles alimentados com 0,5% de óleo essencial. Após desafio bacteriano ocorreram diminuições da Hb nos peixes alimentados com 1,5% de óleo na dieta; volume corpuscular médio com 1,0%; da concentração de hemoglobina corpuscular média com 0 e 1,5%; além de aumentos da proteína nos grupos 0 e 1,5%; da albumina em 0 e 1,0%; do colesterol no controle (0%); e dos triglicérides em 0, 0,5 e 1,5% de óleo na dieta. Conclui-se que o óleo essencial de *M. piperita* na dieta promoveu resposta imune e pode ser utilizado em inclusões de até 1,0% na alimentação de tambaqui.

Palavras-Chave: sistema imune; produto natural; desafio bacteriano; bioquímica.

***Mentha piperita* essential oil in tambaquis *Collossoma macropomum* diets challenged with *Aeromonas hydrophila*: performance and hematological responses**

Abstract

In fish farming, diseases can be minimized by using natural immune stimulants in fish diet. The aim of this study was to evaluate the immunostimulatory potential of the essential oil of *Mentha piperita* in tambaquis diet subsequently challenged with the bacteria *Aeromonas hydrophila*. The animals were fed diets containing 0; 0.5; 1.0; 1.5% inclusion of oil per kg of commercial fish feed twice a day for 30 days. For challenge, fish intraperitoneally were inoculated with bacteria *A. hydrophilla* 1.5×10^8 CFU / mL. Tambaquis' hematological and biochemical parameters were determined after 30 days of feeding and seven days of the challenge. There were no fish mortality during the experiment. The *M. piperita* oil did not influence fish production parameters. Hb increases in fish were observed due to the diets with 0.5% and 1.5%; albumin 1.0%; cholesterol in all groups; and triglycerides in 0.5% essential oil. Following bacterial challenge occurred decreases in Hb fed with 1.5% fish oil in the diet; VCM with 1.0%; the MCHC with 0% and 1.5%; In addition to protein increases in groups 0 and 1.5%; albumin at 0 and 1.0%; cholesterol in the control (0%); and triglyceride levels 0, 0.5 and 1.5% of oil in the diet. Essential oil of *M. piperita* in tambaqui diet promoted immune response and could be used in inclusions of up to 1.0% in the diet of this fish species.

Keywords:immune system; natural product; bacterial challenge; biochemistry.

Introdução

Na aquicultura, o uso de antibióticos e quimioterápicos para tratamento e profilaxia na aquicultura pode trazer diversos impactos negativos, o que leva à busca por produtos alternativos, tais como probióticos e imunoestimulantes oriundos de plantas (Biller-Takahashi e Urbinati, 2014; Mehana *et al.*, 2015). A avaliação do uso de fitoquímicos na aquicultura é uma área relativamente nova de pesquisa, mas que vem trazendo resultados promissores (Anderson, 1992; Logambal *et al.*, 2000; Razali *et al.*, 2008; Citarasu, 2010; Biller-Takahashi e Urbinati, 2014).

O uso de astaxantina em 50 e 100 mg kg⁻¹ na dieta de carpa comum *Cyprinus carpio* estimulou o crescimento, alterando parâmetros hematológicos, resposta imunológicas e aumentou a proteção contra doenças bacterianas específicas (Jagruthi *et al.*, 2014). *Allium sativum* na alimentação de *Lates calcarifer* promoveu alterando parâmetros hematológicos melhorando a captação de oxigênio e resposta imunológicas (Talpur e Ikhwanuddin, 2012). *Ocimum basilicum* aumentou a resistência de *Cyprinus carpio* contra infecção por *A. hydrophila* (Amirkhani e Firouzbaksh, 2015), assim, como a resistência de *L. rohita* quando alimentado com dietas contendo *Magnifera indica* (Sahu *et al.*, 2007).

Na piscicultura, entre as bactérias patogênicas oportunistas a *Aeromonas hydrophila*, tem sido associada a grandes mortalidades de peixes em todo o mundo ao longo da última década, resultando em enormes perdas econômicas (Monette *et al.*, 2006). Essa bactéria está associada frequentemente à septicemia hemorrágica, erosão das nadadeiras, distensão da cavidade abdominal, entre outros sinais clínicos (Paniagua *et al.*, 1990; Joseph e Carnahan, 1994; Jeney e Jeney, 1995). O uso de antibióticos como medida preventiva tem sido questionada (Kaskhedikar e Chhabra, 2010) por causar alterações na microbiota intestinal e induzir a resistência bacteriana. Porém, o uso de

imunoestimulantes têm mostrado efeitos benéficos não apenas como alternativa no manejo durante doenças, assim como na promoção de crescimento e no alcance de melhoria do sistema imunológico (específico e não-específico) (Verschuere *et al.*, 2000; Harikrishnan e Balasundaram, 2008; Harikrishnan *et al.*, 2009 a,b; Biller-Takahashi e Urbinati, 2014; Mehana *et al.*, 2015).

O cultivo de peixes da família Characidae constitui uma grande parte da produção aquícola continental brasileira (IBAMA, 2007). Dentre estes peixes, o tambaqui é uma espécie nativa da região amazônica, muito cultivada e difundida em diversas regiões do Brasil, principalmente no norte e nordeste, e que se adapta com sucesso ao cultivo, devido à boa conversão alimentar, crescimento e manejo fáceis e disponibilidade de juvenis (Chellapa *et al.*, 1995; Val *et al.*, 2000; Izel e Melo, 2004; Tavares-Dias, 2011; MPA, 2012).

O presente estudo avaliou os efeitos imunoestimulantes do uso do óleo essencial de *Mentha piperitana* dieta e desafio com *A. hydrophila* no crescimento e parâmetros hematológicos de tambaqui.

Material e Métodos

Este experimento está autorizado para realização de Pesquisa Científica com as espécies *C. macropomum* e *A. hydrophila* (Processo No. 02001.002877/2014-64), de acordo com a legislação vigente, junto ao IBAMA (No. 002/2008). Espécimes de tambaquis foram adquiridos em piscicultura comercial, com peso médio de $36,0 \pm 7,7$ g, transportados ao galpão de cultivo da Embrapa Amapá (Macapá, AP) e mantidos em condições laboratoriais por 20 dias alimentados com ração comercial para peixes com 32% PB. Vinte peixes por caixa foram distribuídos aleatoriamente em 12 caixas d'água

com capacidade para 500 L conectados a um filtro biológico, com fluxo de água contínuo e aeração constante, mantendo constantes as variáveis físico-químicas: oxigênio dissolvido de $7,32 \pm 0,58$ mg L⁻¹; pH de $7,46 \pm 0,46$; temperatura de $27,78 \pm 0,52$ °C; amônia de $0,4 \pm 0,1$ mg L⁻¹; alcalinidade de $26,43 \pm 14,3$ mg CaCO₃ L⁻¹; dureza de $16,67 \pm 8,56$ mg CaCO₃ L⁻¹. A limpeza das caixas para retirada de excesso de ração e fezes foi realizada a cada três dias.

Quatro dietas foram utilizadas: 0% (ou controle), isenta da inclusão do óleo; 0,5%: inclusão de 0,5%; 1,0%: inclusão de 1,0%; e 1,5%: inclusão de 1,5% do óleo essencial de *M. piperita* por kg de ração comercial. Os tratamentos foram realizados em triplicata, sendo os animais alimentados até a saciedade aparente, duas vezes ao dia (8 e 16 h). O óleo essencial de *M. piperita* foi obtido pelo Laboratório de Plantas Medicinais, Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, AM). Para incorporação do óleo essencial à dieta, soluções para cada nível de inclusão foram preparadas utilizando-se álcool de cereais (Dairiki *et al.*, 2013), adicionando-se óleo essencial de *M. piperita* na quantidade necessária, e por aspersão com pulverizador manual, foram incorporadas a um kg de ração comercial para peixes (32% de PB e granulometria de 4 mm). Após as rações foram secas à temperatura ambiente por 24 horas para serem utilizadas na alimentação dos peixes.

Após o período de alimentação de 30 dias, uma coleta de sangue foi realizada por punção caudal em cinco peixes de cada repetição, utilizando anticoagulante heparina sódica. Os peixes foram previamente anestesiados com benzocaína 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As amostras de sangue foram mantidas em gelo para determinação do hematócrito (Ht), da concentração de hemoglobina (Hb) e da contagem eritrócitos (Eri); e realização do cálculo dos índices hematimétricos de Wintrobe: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e

concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), de acordo com Ranzani-Paiva *et al.* (2013). O sangue remanescente foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 min (Centrifuge 5424) e o plasma obtido para determinação das concentrações de glicose, proteína, albumina, colesterol e triglicérides, através de kits colorimétricos (BioTecnica®) e leituras das absorbâncias realizadas em espectrofotômetro Biospectro (SP-220).

Após a coleta de amostra de sangue, em cinco animais, outros peixes foram desafiados com *A. hydrophila* (ATCC 7966) (Seshadri *et al.*, 2006). Para isto, os animais foram inoculados intraperitonealmente com *A. hydrophila* na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Durante 15 dias foi realizada a observação desses animais, verificando mortalidade e ocorrência de sinais clínicos de aeromonose tais como petéquias hemorrágicas, distensão da cavidade abdominal, lesões ulcerativas na superfície do corpo, hemorragia nas nadadeiras, peixes isolados do cardume, coloração enegrecida, entre outros. Após 7 dias da inoculação da bactéria foi realizada nova coleta de amostra de sangue em nove animais por tratamento.

Os resultados das avaliações hematológicas e bioquímicas dos tambaquis, após a alimentação com dietas os níveis de inclusão de óleo essencial de *M. piperita* (0, 0,5, 1,0 e 1,5%), antes e após do desafio bacteriano foram comparados estatisticamente utilizando-se teste paramétrico ou não-paramétrico ANOVA ($P < 0,05$), após aplicação do teste de normalidade (Zar, 2010), utilizando-se Software Graphpad Instat®.

Resultados

As variáveis físico-químicas da água monitoradas durante o período experimental mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos como satisfatórios para o

cultivo de peixes tropicais de água doce. Nenhuma mortalidade de tambaquis foi observada pelo presente estudo, inclusive com desafio bacteriano. O desafio bacteriano foi realizado com *A. hydrophila* nos tambaquis alimentados com dietas contendo diferentes níveis de óleo essencial de *M. piperita* na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, não causou doenças (por visualização macroscópica) e nem morte dos tambaquis.

Os níveis de inclusão do óleo essencial de *M. piperita* na dieta dos tambaquis não influenciaram os parâmetros de desempenho produtivo de tambaquis, visto que o ganho de peso não indicou diferença significativa, apesar de uma tendência de reduzir a concentração alimentar aparente (CAA) no grupo com inclusão de 1,0% de óleo na dieta (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios (\pm desvio padrão) do peso inicial e final, ganho de peso e conversão alimentar aparente (CAA) dos tambaquis alimentados com dietas (após alimentação por 30 dias) com inclusão de 0, 0,5, 1,0 e 1,5% de óleo essencial de *M. piperita*.

	Níveis de inclusão do óleo <i>M. piperita</i>			
	0%	0,5%	1,0%	1,5%
Peso inicial (g)	$20,35 \pm 4,84$ a	$20,74 \pm 4,64$ a	$20,19 \pm 4,74$ a	$20,10 \pm 3,33$ a
Peso final (g)	$75,81 \pm 22,39$ a	$63,56 \pm 36,09$ a	$59,13 \pm 23,03$ a	$68,74 \pm 27,74$ a
Ganho de peso (g)	$58,15 \pm 19,21$ a	$44,20 \pm 34,54$ a	$38,94 \pm 22,69$ a	$48,64 \pm 28,36$ a
CAA	1,07	1,42	1,66	1,28

Não houve diferença estatística ($P>0,05$).

Houve aumento significativo da concentração de hemoglobina em tambaquis alimentados com dietas contendo 0,5 e 1,5% de óleo essencial de *Mentha*, com relação às demais dietas. Após a infecção com a bactéria *A. hydrophila*, ocorreu diminuição da Hb dos peixes alimentados com 1,5% na dieta ($P<0,05$). A inclusão do óleo essencial não alterou o VCM dos tambaquis, entretanto diminuiu após o desafio bacteriano nos

peixes do grupo alimentado com dietas com 1,0% de inclusão de óleo de *M. piperita*. A alimentação com *M. piperita* alterou os valores de CHCM, entretanto, com o desafio com *A. hydrophila* os valores diminuíram nos tambaquis dos grupos controle (0%) e com 1,5% de óleo na dieta (Tabela 2).

Tabela 2. Hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina (Hb), contagem de eritrócitos (Eri) e índices hematimétricos (volume corpuscular médio, VCM; hemoglobina corpuscular média, HCM e concentração de hemoglobina corpuscular média, CHCM) (média ± desvio padrão) de tambaquis alimentados com dietas com diferentes níveis de inclusão (0, 0,5, 1,0 e 1,5%) do óleo essencial de *M. piperita*, antes e sete dias após o desafio bacteriano com *A. hydrophila*.

Níveis de inclusão do óleo essencial <i>M. piperita</i>				
	0% (Controle)	0,5%	1,0%	1,5%
Antes do desafio bacteriano				
Ht (%)	17,54 ± 3,73a	19,75 ± 3,36a	18,20 ± 4,16a	19,65 ± 2,22a
Hb (g dL ⁻¹)	5,71 ± 1,27a	6,83 ± 0,98b	6,30 ± 1,32a	7,76 ± 0,62b
Eri (x10 ⁶ µL ⁻¹)	1,04 ± 0,34a	0,93 ± 0,25a	0,94 ± 0,35a	1,04 ± 0,34a
VCM (fL)	181,09 ± 62,41a	192,20 ± 58,43a	169,25 ± 41,52a	181,09 ± 62,41a
HCM (g dL ⁻¹)	70,33 ± 14,37a	65,97 ± 15,98a	67,24 ± 10,74a	65,63 ± 10,29a
CHCM (g dL ⁻¹)	42,46 ± 16,76a	35,69 ± 13,33a	40,15 ± 15,51a	42,46 ± 16,76a
Após desafio bacteriano				
Ht (%)	20,05 ± 2,97a	19,94 ± 3,08a	16,28 ± 4,53a	18,50 ± 3,31a
Hb (g dL ⁻¹)	5,29 ± 2,26a	5,94 ± 1,64a	4,60 ± 2,21a	4,29 ± 1,79a*
Eri (x10 ⁶ µL ⁻¹)	0,66 ± 0,18a	0,71 ± 0,22a	0,89 ± 0,37a	1,21 ± 0,24a
VCM (fL)	271,90 ± 176,32a	248,37 ± 139,73a	107,85 ± 38,73a*	187,59 ± 106,33a
HCM (g dL ⁻¹)	95,82 ± 27,79bc	75,59 ± 22,23ac	51,26 ± 10,65a	60,71 ± 14,19a
CHCM (g dL ⁻¹)	35,72 ± 16,37a*	35,95 ± 18,66a	46,70 ± 18,03a	36,32 ± 18,80a*

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre os níveis de inclusão; asterisco (*) indica diferença significativa ($P<0,05$) entre os valores antes e após o desafio bacteriano.

A concentração plasmática de glicose dos tambaquis alimentados com dietas contendo *M. piperita* não alterou em nenhuma das concentrações, mesmo após o desafio bacteriano. A concentração plasmática de proteína dos tambaquis apenas mostrou alteração após desafio bacteriano, com valores aumentados nos grupos 0 e 1,5% do óleo essencial na dieta. Níveis aumentados de albumina nos tambaquis foram verificados nos grupos alimentados com dietas com 0 e 1,0% do óleo (Tabela 03).

Tabela 3. Valores médios (\pm desvio padrão) das concentrações plasmáticas de glicose, proteínas, albumina, colesterol e triglicérides de tambaquis alimentados com dietas com diferentes níveis de inclusão (0, 0,5, 1,0 e 1,5%) do óleo essencial de *M. piperita*, antes e sete dias após o desafio bacteriano com *A. hydrophila*.

Níveis de inclusão do óleo essencial <i>Mentha piperita</i>				
	0%	0,5%	1,0%	1,5%
Antes do desafio bacteriano				
Glicose (mg dL ⁻¹)	79,25 \pm 22,50a	87,85 \pm 24,93a	85,48 \pm 20,80a	76,49 \pm 18,02a
Proteína (g dL ⁻¹)	3,07 \pm 0,59a	2,81 \pm 0,81a	2,68 \pm 0,54a	2,50 \pm 0,45a
Albumina (g dL ⁻¹)	0,94 \pm 0,23a	0,89 \pm 0,17a	0,95 \pm 0,17a	1,00 \pm 0,23a
Colesterol (mg dL ⁻¹)	62,85 \pm 9,83a	83,78 \pm 16,71b	86,64 \pm 39,92b	98,93 \pm 18,61b
Triglicérides (mg dL ⁻¹)	272,96 \pm 29,93ac	224,76 \pm 54,30a	271,49 \pm 60,49ac	286,17 \pm 45,21bc
Após desafio bacteriano				
Glicose (mg dL ⁻¹)	79,50 \pm 7,21a	76,81 \pm 20,55a	74,61 \pm 16,74a	81,89 \pm 10,92a
Proteína (g dL ⁻¹)	3,44 \pm 0,73b*	3,14 \pm 0,42a	3,30 \pm 0,25b	3,23 \pm 0,36a*
Albumina (g dL ⁻¹)	1,09 \pm 0,10a*	0,98 \pm 0,20a	1,48 \pm 0,14b*	0,97 \pm 0,12a
Colesterol (mg dL ⁻¹)	137,37 \pm 11,80a*	127,58 \pm 48,54a	114,65 \pm 9,28a	118,18 \pm 19,39a
Triglicérides (mg dL ⁻¹)	472,57 \pm 32,78b*	290,12 \pm 32,60a*	306,28 \pm 63,60a	422,15 \pm 38,47b*

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre os níveis de inclusão; asterisco (*) indica diferença significativa ($P<0,05$) entre os valores antes e após o desafio bacteriano.

Os níveis de colesterol plasmático aumentaram em todos os tambaquis alimentados com dietas com óleo essencial (de 0,5 a 1,5% de inclusão por kg de ração). Após o desafio bacteriano, apenas o grupo controle mostrou aumento significativo. Os níveis de triglicérides plasmáticos foram menores nos tambaquis após alimentação com 0,5% de óleo essencial, entretanto após o desafio com *Aeromonas*, os grupos 0, 0,5 e 1,5% de óleo na dieta apresentaram valores significativamente aumentados.

Discussão

Os níveis de inclusão de 0,5 a 1,5% do óleo essencial de *M. piperita* utilizados na dieta de tambaquis, do presente estudo, não promoveram ganho de peso e crescimento nas concentrações usadas. Em contraste aos estudos de Talpur (2014) relataram ganho de peso corporal em *L. calcarifer* alimentados com 2 a 5 g de folhas *M. piperita* por kg de ração, inclusive indicando boa taxa de conversão alimentar quanto maior o nível dessa planta, pois esta estimula o apetite. Assim, verifica-se que a forma de uso da planta, seja de suas folhas (Talpur, 2014) ou de seu óleo essencial (Sharafi *et al.*, 2010), podem influenciar na aceitação pelos peixes e na ação de seus compostos bioativos.

O coeficiente de variação, que podem ser calculados a partir dos valores de média e desvio padrão, do peso final dos tambaquis após alimentação com óleo essencial de *M. piperita*, mostrou-se maior (57%), quando alimentados com dietas com inclusão de 0,5% do óleo essencial, com relação aos demais grupos; nesses grupos experimentais foi de 29% para os animais sem óleo essencial na dieta (controle); de 39% para os animais alimentados com 1,0% de inclusão de óleo na dieta; e de 40% quando incluído 1,5% de óleo na dieta. Isto pode indicar que não houve boa aceitação das dietas com inclusão deste óleo pelos peixes, principalmente pelos peixes

alimentados com dietas com apenas 1,5% de *M.piperita*. Os peixes que podem ter melhor aceitado a dieta podem ter sido os que foram alimentados com inclusão de 1,0% do óleo, devido ao CAA ser de 1,66. Entretanto, em termos de desempenho, os animais com melhor CAA foram os não alimentados com óleo essencial.

Os tambaquis que foram alimentados com as dietas contendo óleo de *M.piperitapor* um período de 30 dias e desafiados com *A. hydrophila* não apresentaram nenhuma morte e nenhum sinal aparente de bacteriose. Podendo ser resultado da imunoestimulação devido a dieta com *M. piperita*, como já relatado em outros espécimes(Sharafi *et al.*, 2010; Bairwa *et al.*, 2012; Biller-Takahashi e Urbinati, 2014; Mehana *et al.*, 2015) utilizada como imunoestimulantes. De acordo com Amirkhani e Firouzbaksh (2015) dietas suplementadas com extrato etanólico de *Ocimum basilicum* aumentou a resistência de *Cyprinus carpio* contra infecção por *A. hydrophila*, devido à melhoria no sistema imunológico não-específico; assim como ocorreu em *L. rohita* alimentado com dietas contendo *Magnifera indica* e desafiados também com *A. hydrophila* (Sahu *et al.*, 2007).

O aumento da concentração de hemoglobina nos tambaquis alimentados com dietas contendo 0,5 e 1,5% de óleo essencial de *Mentha* pode estar relacionado ao aumento do suprimento de oxigênio, o que promove bem estar nos animais. Resultados similares foram observados em *L. calcarifer* quando alimentados com dietas com inclusão de *Allium sativum* (Talpur e Ikhwanuddin, 2012) e com folhas de *Mentha* (Talpur, 2014). Com a infecção bacteriana ocorreu diminuição da Hb dos tambaquis alimentados com inclusão de 1,5% do óleo na dieta ($P<0,05$), podendo ser resultado do estresse induzido pelo patógeno, conforme relatado por Talpur e Ikhwanuddin (2012) para *L. calcarifer*. A Hb e o CHCM dos tambaquis após desafio com *A. hidrophilla* apresentaram redução, consequentemente diminuindo a capacidade de transporte do O_2

pelos peixes (Vijayan *et al.*, 1997). Nos tilapias pode-se observar a diminuição do VCM após desafio bacteriano nos peixes do grupo alimentado com dietas com 1,0% de óleo essencial de *M. piperita*, provavelmente devido à tendência ao aumento do número de eritrócitos no sangue quando alimentados com dietas com inclusão em 1,0% do óleo essencial de *M. piperita*.

A alimentação dos tilapias com dietas contendo *M. piperita* não promoveu estresse nos animais, indicado pela manutenção da glicose plasmática em níveis semelhantes aos controles, mesmo com a aplicação do desafio bacteriano com *A. hydrophila*. De acordo com Talpur (2014) a inclusão de *M. piperita* estimula ação da insulina, por isso também ocorreu níveis reduzidos de glicose em *L. calcarifer* após alimentação, sendo que após o desafio a redução da glicose pode ser atribuída ao jejum em consequência à presença do patógeno.

Nos tilapias dos grupos controle e com inclusão em 1,5% observou-se aumento da concentração plasmática de proteína após desafio bacteriano. A alimentação com alho, gengibre e nim (*Azadirachta indica*) (Talpur e Ikhwanuddin, 2012; 2013 a,b) aumentaram a concentração de proteína plasmática em *L. calcarifer*; assim, como ocorreu em *C. carpio* alimentados com extrato de *M. piperita*, (Abasali e Mohamad, 2010); diferentemente do que ocorreu com tilapias deste estudo, onde os níveis de proteína mantiveram-se constantes. Dessa forma, a exposição dos peixes às situações de estresse pode resultar em uma série de ajustes por mecanismos de homeostase (Almeida-Val *et al.*, 2006).

Níveis aumentados de albumina no plasma dos tilapias foram observados após desafio bacteriano nos grupos sem óleo e com 1,0% de inclusão de óleo na dieta. Visto que as proteínas plasmáticas incluem diversos elementos humorais do sistema imune não específico, este aumento da albumina no nível de inclusão de 1,0% pode

refletir o aumento da resposta imune não-específica dos tambaquis. Sahu *et al.* (2007) relataram que os níveis de proteínas, como albumina e globulina em juvenis de *L. rohita* alimentados *M. indica* foram maiores que os controles.

Os níveis de colesterol plasmático aumentaram em todos os tambaquis alimentados com óleo essencial de *M. piperita*. Após o desafio com *A. hydrophila* ocorreu aumento apenas no grupo controle. O nível de triglicérides plasmáticos diminuíram significativamente nos tambaquis alimentados com dietas com inclusão de 0,5%. Com o desafio bacteriano, os maiores valores foram nos grupos controle e com as inclusões de 0,5 e 1,5% do óleo de *M. piperita*. Porem em *L. calcarifer* alimentação com dietas contendo *M. piperita* ocorreu redução de lipídios totais, triglicérides e colesterol (Talpur, 2014).

Conclui-se que as alterações hematológicas e bioquímicas em tambaquis alimentados com óleo essencial de *M. piperita* na dieta indicaram efeitos imunoestimulantes positivos, com melhora na imunidade não-específica do peixe, evitando mortalidades após o desafio bacteriano com *A. hydrophila*, possibilitando a recomendação de seu uso em dietas para peixes em até 1,0% de inclusão. Além disso, mais estudos utilizando outros níveis de inclusão do óleo essencial de *M. piperita* na alimentação de tambaqui e com períodos diferenciados de alimentação são necessários para se obter informações a respeito dos efeitos fisiológicos desse imunoestimulante nos peixes.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá (FAPEAP) pelo apoio financeiro.

Bibliografia citada

- Abasali, H.; Mohamad, S. 2010. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets. Agricultural Journal, 5 (3): 163-172.
- Almeida-Val, V.M.F.; Chippari-Gomes, A.R.; Lopes, N.P. 2006. Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fishes of the Amazon. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. and Randall, D.J. (Eds.), Fish Physiology. Heidelberg: Elsevier, p. 443-500, v. 21.
- Amirkhani, N.; Firouzbaksh, F. 2015. Protective effects of basil (*Ocimum basilicum*) ethanolic extract supplementation diets against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture Research, 46: 716-724.
- Anderson, D.P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. Annual Review of Fish Diseases, 2: 281-307.
- Bairwa, M.K.; Jakhar, J.K.; Satyanarayana, Y.; Reddy A.D. 2012. Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. Journal of Natural Products Resources, 2 (3): 397-400.
- Biller-Takahashi, J.D.; Urbinati, E.C. 2014. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 86 (3): 75-87.
- Chellappa, S.; Chellappa, N.T.; Barbosa, W.B.; Huntingford, F.A.; Beveridge, M.C.M. 1995. Growth and production of the Amazonian tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. Aquaculture International, 3 (1): 11-21.
- Citarasu, T. 2010. Herbal medicines: a new opportunity for aquaculture industry. Aquaculture International, 18: 403-414.

- Dairiki, J.K., Majolo, C.; Chagas, E. C.; Chaves, F.C.M.; Oliveira, M.R.; Moraes, I.S. 2013. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. Circular Técnica, 42, 8p.
- Harikrishnan R.; Balasundaram, C. 2008. In vitro and in vivo studies of the use of some medicinal herbals against fish pathogen *Aeromonas hydrophila* in goldfish. Journal of Aquatic Animal Health, 20 (3): 165-176.
- Harikrishnan, R.; Balasundaram, C.; Heo, M.-S. 2009b. Effect of chemotherapy, vaccines and immunostimulants on innate immunity of goldfish infected with *Aeromonas hydrophila*. Diseases of Aquatic Organisms, 88 (1): 45-54.
- Harikrishnan, R.; Balasundaram, C.; Kim, M.-C.; Kim, J.-S.; Han, Y.-T.; Heo, M.-S. 2009a. Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. Fish & Shellfish Immunology, 27 (3): 508-515.
- IBAMA, 2007. Estatística da Pesca 2007. Brasil: grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, DF, 2007. 113 p.
- Izel, A.C.U.; Melo, L.A.S. 2004. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques escavados no estado do Amazonas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, Série Documentos, v. 32, 19 p.
- Jagruthi C.; Yogeshwari, G.; Anbazahan, S.M.; Mari, L.S.S.; Arockiaraj, J.; Mariappan, P.; et al. 2014. Effect of dietary astaxanthin astaxanthin against *Aeromonas hydrophila* infection in common carp, *Cyprinus carpio*. Fish & Shellfish Immunology, 41 (2): 674-680.
- Jeney, Z.; Jeney, G. 1995. Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture, 129, 397-420.
- Joseph, S.W.; Carnahan, A. 1994. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. Annual Review of Fish Diseases, 4: 315-343.

- Kaskhedikar M.; Chhabra, D. 2010. Multiple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. *Veterinary World*, 3 (2): 76-77.
- Logambal, S.M.; Venkatalakshmi, S.; Michael, R.D. 2000. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Hydrobiologia*, 430, 113-120.
- Mehana, E.E.; Rahmani, A.H.; Aly, S.M. 2015. Immunostimulants and fish culture: an overview. *Annual Research & Review in Biology*, 5(6); 477-489.
- Monette, S.; Dallaire, A.D.; Mingelbier, M.; Groman, D.; Uhland, C.; Richard, J.-P.; Paillard, G.; Johannson, L.M.; Chivers, D.P.; Ferguson, H.W.; Leighton, F.A.; Simko, E. 2006. Massive mortality of common carp (*Cyprinus carpio carpio*) in the St. Lawrence River in 2001: diagnostic investigation and experimental induction of lymphocytic encephalitis. *Veterinary Pathology*, 43 (3): 302-310.
- MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura de 2012*. Disponível em www.mpa.gov.br/images./docs/informaoes. Acesso em 10 de março de 2013.
- Paniagua, C., Rivero, O., Anguita, J.; Naharro G. 1990. Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (2): 350-355.
- Ranzani-Paiva, M.J.; Pádua, S.B; Tavares-Dias, M.; Egami, M. 2013. *Métodos para análise hematológica em peixes*. Maringá: Eduem, 140 p.
- Razali, N., Razab, R.; Junit, S.M.; Aziz, A.A. 2008. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chemistry*, 111, 38-44.
- Sahu, S.; Das, B.K.; Pradhan, J.; Mohapatra, B.C.; Mishra, B.K.; Sarangi, N. 2007. Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to

Aeromonas hydrophila in *Labeo rohita* fingerlings. Fish & Shellfish Immunology, 23 (1), 109-118.

Seshadri, R.; Joseph, S.W.; Chopra, A.K.; Sha, J.; Shaw, J.; Graf, J.; Haft, D.; Wu, M.; Ren, Q.; Rosovitz, M.J.; Madupu, R.; Tallon, L.; Kim, M.; Jin, S.; Vuong, H.; Stine, O.C.; Ali, A.; Horneman, A.J.; Heidelberg, J.F. 2006. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966^T: Jack of all trades. Journal of Bacteriology, 88 (23): 8272-8282.

Sharafi, S.M.; Rasooli, I.; Owlia, P.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S.D.A. 2010. Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. Pharmacognosy Magazine, 6 (23): 147-153.

Talpur, A.D. 2014. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, 420-421: 71-78.

Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M. 2013b. *Azadirachta indica* (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*. Fish & Shellfish Immunology, 34: 254-264.

Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., 2013a. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. Aquaculture, 400-401: 46 –52.

Talpur, A.D.; Ikhwanuddin, M. 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). Aquaculture, 364-365: 6-12.

Tavares-Dias, M. 2011. Piscicultura continental no Estado do Amapá: diagnóstico e perspectivas. Macapá: Embrapa Amapá, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, v. 81, 42 p.

Val, A.L.; Rolim, P.R.; Rabelo, H. 2000. Situação atual da aquicultura na região Norte.

In: Aquicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável. Valenti, W.C.;

Poli, C.R.; Pereira, J.A.; Borghetti, J.R. Brasília: CNPq, p.247-266.

Verschueren L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P.; Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4): 655-671.

Vijayan, M.M.; Pereira, C.; Grau, E.G.; Iwama, G.K. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry Physiology*, 116C (1): 89-95.

Zar, J.H. 2010. Biostatistical analysis. 5th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 944 p.

7. CONCLUSÕES

- Os resultados do presente estudo permitem concluir que a inclusão do óleo essencial de *M. piperita* na dieta de tambaquis *C. macropomum* não promoveu maior crescimento dos animais, quando comparado aos animais que não receberam o óleo através da dieta;
- A inclusão de óleo essencial de *M. piperita* moveu certas alterações hematológicas, como aumento da concentração de hemoglobina do sangue, podendo como consequência aumentar a capacidade respiratória dos animais durante o cultivo;
- A inclusão de óleo essencial de *M. piperita* causou aumento dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides nos animais, indicando alteração no metabolismo hepático, que deve ter aprofundada sua investigação em estudos futuros;
- Este óleo essencial na dieta pode atuar possivelmente como imunoestimulante, proporcionando resistência aos tambaquis quando submetidos ao desafio experimental com *A. hydrophila*, pois evitou mortalidade dos peixes durante o cultivo;
- Os tambaquis apresentaram alterações bioquímicas quando receberam dieta com 1,5% do óleo essencial de *M. piperita*, assim pode-se recomendar em até 1,0% de inclusão em dietas para o cultivo de tambaquis, pelo período de 30 dias.