



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL CURSO**  
**DE MESTRADO**

**INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE *Zingiber officinale***  
**rosc. NA DIETA DO CACHARA *Pseudoplatystoma reticulatum***

Rômulo Guilherme dos Santos Almeida

CAMPO GRANDE, MS

2020



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



2019, INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE (*Zingiber officinale* rosc.) NA DIETA DO CACHARA (*Pseudoplatystoma reticulatum*), Almeida.



Serviço Público Federal

Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**  
**CURSO DE MESTRADO**

**INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE *Zingiber***  
***officinale* rosc. NA DIETA DO CACHARA *Pseudoplatystoma***  
***reticulatum***

Inclusion of ginger essential oil *Zingiber officinale* Rosc. in  
the cachara diet *Pseudoplatystoma reticulatum*

**Rômulo Guilherme dos Santos Almeida**

**Orientadora: Cristiane Meldau de Campos Amaral**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Aquicultura e nutrição de não ruminantes.

CAMPO GRANDE, MS

2020



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



Dedico

A Deus, por me prover, a força de vontade, saúde e humildade necessária para  
completar mais essa etapa e perseverar a cada dia.

Aos meus pais pelo apoio, amor, dedicação e investimento sempre a mim fornecido e  
aos meus irmãos, pelo apoio e atenção a mim dedicado sempre quando necessário.



### **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e o programa de pós-graduação em ciência animal, assim como, a todos os docentes e funcionários, que fizeram parte de minha trajetória;

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Sanidade de peixes, por todo auxílio e amizade durante o período que participei das atividades laboratoriais;

A minha orientadora professora Cristiane Meldau de Campos, por todo o apoio, paciência, ensinamentos, tempo dedicado a mim, e sim, pelas broncas também, que foram de suma importância para a realização do trabalho;

Aos professores Jayme Aparecido Povh e Carlos Eurico Fernandes, por todo auxílio, conselhos, disponibilidade e ensinamentos, sempre da melhor forma e quando necessário;

A CAPES pelos meses de bolsa de mestrado;

À Rodrigo Kasai, pela acessibilidade e disponibilizar os peixes para o trabalho;

À Todos meus colegas de turma;

À Fúlvia, Ana Carla, Dila, Gleice Kelli, Gleice Souza, Fayane, Marilda e Rúbia por toda a ajuda, amizade, disponibilidade e parceria em todos os momentos de trabalho;

À Meus pais e irmãos;

À Deus;

**OBRIGADO.**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



*“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença”.*

*Benjamin Franklin*

## Resumo

ALMEIDA R.G.S. Inclusão do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* rosc.) Na dieta do cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*). 2020. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

A busca por aditivos naturais que hajam como imunoestimulantes, melhorando a resitência dos peixes frente a desafios sanitários e refletindo no maior desempenho zootécnico dos animais, pode funcionar como alternativa à utilização de produtos quimioterápicos e antimicrobianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inclusão dietética do óleo essencial de gengibre sobre variáveis hematoimunológicas de juvenis de cacharas *Pseudoplatystoma reticulatum* alimentados durante 65 dias e, posteriormente submetidos a um estresse induzido e desafiados com *Aeromonas hydrophila*. O experimento foi dividido em dois ensaios. No primeiro foram utilizados 108 juvenis de cachara de  $40,23 \pm 17,38$  g e  $18,59 \pm 2,78$  cm, distribuídos aleatoriamente em 12 tanques, em delineamento inteiramente casualizado, constituído por quatro grupos de inclusão de óleo essencial de gengibre divididos nos seguintes níveis: 0%, 0,5%, 1,0% e 1,5% de inclusão do óleo com três repetições cada, alocando nove animais por tanque. Ao final de 65 dias foi realizada a colheita sanguínea de dois animais por grupo experimental com análise das variáveis hematológicas e imunológicas: contagem de eritrócitos, glicose, hemoglobina, microhematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, contagem total de leucócitos, trombócitos, atividade respiratória de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos. Os dados foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias. No segundo ensaio, com os peixes suplementados em sua dieta com o óleo essencial de gengibre foi realizado estresse induzido com posterior amostragem de dois peixes para colheita e análise sanguínea (0-Estresse), com os demais juvenis, sendo desafiados com *Aeromonas hydrophila*. Decorrido 24 horas do desafio foram realizadas colheitas sanguíneas. Os dados provenientes do segundo ensaio foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial 4x2 (4 dietas e 2 tempos de coleta 0-Estresse e 24 h), e teste de Tukey. Após as análises das variáveis não foi observada diferença ( $p>0,05$ ) para as variáveis hematológicas dos cacharas alimentados com o óleo durante 65 dias. Foi observada interação entre o tempo 24 horas e tratamentos para o hematócrito com 16,50; 31,00; 43,33 e 35,50% nos tratamentos 0,0%; 0,5%; 1,0% e 1,5% respectivamente, não houve diferença significativa entre os tratamentos com alguma inclusão do óleo. Para os tratamentos com inclusão do óleo essencial foi observado diferença ( $p<0,05$ ) na proporção de monócitos entre os tempos, com redução após 24 horas do desafio. A inclusão dietética do óleo essencial de gengibre durante 65 dias não influenciou nas variáveis hematológicas e imunológicas dos juvenis de cachara. Entretanto, após estresse induzido e desafio por *Aeromonas hydrophila* os peixes alimentados com 0,5% do óleo essencial apresentaram resposta mais eficiente a ação do patógeno.

*Palavras-chave: Desafio bacteriano, parâmetros imunológicos, imunoestimulantes, parâmetros hematológicos.*

## Abstract

ALMEIDA R.G.S. Inclusion of ginger essential oil (*Zingiber officinale* rosc.) in the cachara diet (*Pseudoplatystoma reticulatum*). 2020. Dissertation – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

The production systems are often associated with inadequacies such as high stocking densities, inadequate feeding and handling problems, which can culminate in the emergence of pathogens and production losses. Thus, it is important to seek natural additives that have as immunostimulant, reflecting the higher growth performance of animals, working as an alternative to artificial products. The objective of this work was evaluate the effect of the dietary inclusion of ginger essential oil on the hematological and immune variables of juveniles of *Pseudoplatystoma reticulatum* after 65 days of feeding, and after being subjected to induced stress and challenged with *Aeromonas hydrophila*. Two tests were carried out in the research, the first were used 108 juveniles of cachara with  $40.23 \pm 17.38$  g and  $18.59 \pm 2.78$  cm were randomly distributed in 12 tanks, in a completely randomized design, consisting of four groups of inclusion of essential oil of ginger divided into the following levels : 0%, 0.5%, 1.0% and 1.5% of oil inclusion with three replicates each, allocating nine animals per tank. At the end of 65 days, blood was collected from two animals per experimental group with analysis of hematological and immunological variables: erythrocyte count, glucose hemoglobin, microhematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, total leukocyte count, thrombocytes, activity respiratory leukocyte count and differential leukocyte count. The data were submitted to analysis of variance and Tukey's test for comparison of means. In the second test, with fish supplemented in their diet with ginger essential oil, induced stress was performed with subsequent sampling of two fish for collection and blood analysis (0-Stress), with the other juveniles, being challenged with *Aeromonas hydrophila*. After 24 hours of the challenge, blood samples were taken. The data from the second trial were subjected to analysis of variance in a 4x2 factorial scheme (4 diets and 2 collection times 0-Stress and 24 h), and Tukey test. After the analysis of the variables, no difference was observed ( $p > 0.05$ ) for the hematological variables of cacharas fed with oil for 65 days. An interaction was observed between the time of 24 hours and treatments for hematocrit at 16.50; 31.00; 43.33 and 35.50% in the treatments 0,0%; 0.5%; 1.0% and 1.5% respectively, there was no significant difference between treatments with some inclusion of the oil. For treatments with the inclusion of essential oil, a difference ( $p < 0.05$ ) was observed in the proportion of monocytes between times, with a reduction after 24 hours of challenge. The dietary inclusion of ginger essential oil for 65 days did not influence the hematological and immunological variables of cachara juveniles. However, after induced stress and challenge by *Aeromonas hydrophila*, fish fed 0.5% of the essential oil showed a more efficient response to the pathogen's action.

**Keywords:** Bacterial challenge, immunological parameters, immunostimulant, hematological parameters

## Lista de figuras

- Figura 1.** Ulcerações cutâneas em piracanjuba – Fonte (Figueredo et al., 2014); B- Pontos hemorrágicos no abdômen de juvenil de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) – Fonte pessoal.....14
- Figura 2.** Exemplar de juvenil de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* (Arquivo pessoal) .....22
- Figura 3.** Delineamento experimental.....35
- Figura 4.** Glicose de juvenis de cacharas alimentados por 65 dias com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (0,0%; 0,5%; 1,0%; 1,5%), n= 9 peixes por tratamento.....41
- Figura 5.** Total de leucócitos (A) e trombócitos (B) de juvenis de cacharas alimentados por 65 dias com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (0,0%; 0,5%; 1,0%; 1,5%), n= 9 peixes por tratamento.....42
- Figura 6.** Contagem de monócitos ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) em cacharas alimentados por 65 dias com óleo essencial de gengibre em diferentes concentrações, estressados e inoculados com *Aeromonas hydrophila* ( $0,34 \times 10^6$  UFC). 30 minutos após o estresse (0-Estresse; n=6/Tratamento) e após 24 horas da infecção bacteriana (24 h; n=3/Tratamento) .....45
- Figura 7.** Contagem de monócitos ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) em juvenis de cacharas alimentados por 65 dias com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre. Após 30 minutos do estresse induzido (0-Estresse), n= 9 peixes por tratamento.....45
- Figura 8.** Hematócrito (%) em cacharas alimentados por 65 dias com óleo essencial de gengibre em diferentes concentrações, estressados e inoculados com *Aeromonas hydrophila* ( $0,34 \times 10^6$  UFC). 30 minutos após o estresse (0-Estresse; n=6/Tratamento) e após 24 horas da infecção bacteriana (24 h; n=3/Tratamento) .....46
- Figura 9.** Hematócrito (%) em juvenis de cacharas alimentados por 65 dias com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre. Após 24 horas de infecção por *Aeromonas hydrophila* ( $0,34 \times 10^6$  UFC), n= 3 peixes por tratamento.....46

## Lista de tabelas

**Tabela 1** Composição química do óleo essencial de *Zingiber officinale*.....38

**Tabela 2.** Parâmetros hemato-imunológicos (média  $\pm$  desvio padrão) de cacharas (peso médio=  $65,94 \pm 27,17$  g) após 65 dias de alimentação com inclusão dietética de óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* rosc.) em diferentes concentrações. VCM= Volume corpuscular médio, CHCM= Concentração de hemoglobina corpuscular média, ARL= Atividade respiratória dos leucócitos. n= 9 peixes por tratamento.....41

**Tabela 3.** Parâmetros hemato-imunológicos (média  $\pm$  desvio padrão) de cacharas alimentados com inclusão de diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* rosc.), após estresse induzido (0-Estresse) e desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*.....44

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1. Enfermidades na piscicultura.....	13
1.2. Estresse em peixes .....	15
1.3. Imunidade em peixes .....	16
1.4. Ação dos Imunoestimulantes nos peixes .....	18
1.5. Aditivos imunoestimulantes .....	18
1.6. Biologia e aspectos produtivos do cachara ( <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> )..	21
2. OBJETIVO.....	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23
Resposta hemato-imunológica de cacharas alimentados com dietas contendo óleo essencial de gengibre e submetidos a desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	31
1. Introdução.....	33
2. Material e Métodos.....	34
2.1. Peixes, condições e dietas experimentais .....	34
2.2. Delineamento experimental .....	35
2.2.1 Primeiro ensaio experimental .....	36
2.2.2 Segundo ensaio experimental .....	36
2.3. Preparo da bactéria e desafio bacteriano.....	37
2.4. Colheita sanguínea e análises hemato-imunológicas.....	37
2.5. Composição do óleo essencial. ....	38
2.6. Análise estatística e ética na pesquisa.....	39
3. Resultados.....	40
3.1. Primeiro ensaio experimental .....	40
3.2. Segundo ensaio experimental .....	43
4. Discussão.....	47
4.1. Primeiro ensaio experimental .....	47
4.2. Segundo ensaio experimental .....	48
5. Conclusão .....	50
6. Referências bibliográficas .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

1 Com o objetivo de manter a expansão da produção aquícola brasileira, que é um  
2 dos ramos da produção animal que mais cresceu na última década para atender as  
3 demandas das populações, são desenvolvidas novas tecnologias e técnicas de manejo para  
4 os diferentes sistemas de produção (FAO, 2018). Contudo, os sistemas piscícolas estão  
5 muitas vezes associados a inadequações como densidades de estocagem excessivas,  
6 alimentação inadequada, má formulação das dietas e problemas de manejo, que podem  
7 ocasionar estresse excessivo nos animais comprometendo suas defesas imunológicas com  
8 posterior surgimento de enfermidades uma vez que, os organismos de potencial  
9 patogênico em diversos casos estão presentes na água como também no próprio animal  
10 (Harikrishnan et al., 2011; Tavechio et al., 2009).

11 O surgimento dessas enfermidades com possível mortalidade dos peixes já é  
12 categorizado como uma das maiores causas de prejuízo para a piscicultura e, com o intuito  
13 de controlar a proliferação desses patógenos são utilizados antibióticos sintéticos  
14 (Tavechio et al., 2009). Esses antibióticos podem elevar os custos de produção,  
15 contaminar a carne destinada ao mercado, a água que é liberada para o meio ambiente, se  
16 mal administrados têm alto potencial tóxico e podem provocar o surgimento de patógenos  
17 resistentes aos medicamentos pela frequente manipulação (Brum et al., 2018;  
18 Harikrishnan et al., 2011).

19 Desse modo, é de suma importância utilizar alternativas sustentáveis para o  
20 controle e prevenção desses patógenos, que possuam menor potencial de contaminação  
21 do pescado. Neste sentido, uma das alternativas é a utilização de aditivos naturais com  
22 potencial imunostimulante, pois apresentam menor toxicidade, aumentam a resposta  
23 imune do peixe e menor risco de seleção de patógenos com resistência (Brum et al., 2018).

24 Entre eles, os óleos essenciais são aditivos extraídos de folhas, flores, caule, raiz  
25 e sementes, com aplicações terapêuticas que incluem tanto o tratamento quanto a  
26 prevenção de enfermidades (Dairiki et al., 2013). O gengibre (*Zingiber officinale* rosc.),  
27 é uma espécie que possui rizoma articulado cujo óleo essencial possui efeito anti-  
28 inflamatório, analgésico, imunostimulante, antioxidante e antimicrobiano, é  
29 administrado para modular a resposta imune e proporcionar resistência a doenças, tantos  
30 em humanos como animais, inclusive peixes (Ali et al., 2008; Shakya et al., 2015).

1 São escassos ou inexistentes trabalhos avaliando os efeitos óleo essencial de  
2 gengibre na dieta do cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) como imunestimulante,  
3 sendo este um estudo pioneiro, porém, o óleo já foi testado como anestésico para o peixe  
4 (Silva et al., 2020). Essa espécie habita as principais bacias hidrográficas sul-americanas,  
5 como a Amazônia e do Prata (Romagosa et al., 2003), possui potencial econômico e  
6 excelente aceitação no mercado, pelas suas características organolépticas positivas para  
7 produção, como textura firme da carne, bom rendimento de carcaça, ausência de sabor  
8 acentuado de peixe e de espinhas intramusculares (Coelho, 2005; Neto et al., 2010).

### 9 10 **1.1. Enfermidades na piscicultura** 11

12 Durante o cultivo de peixes podem ocorrer inadequações, que expõem os animais  
13 a condições adversas de qualidade da água e práticas de manejo, tais como, manuseio  
14 impróprio, transporte, densidade de estocagem excessiva e má formulação das dietas.  
15 Esses fatores negativos causam consequências prejudiciais sobre o desempenho  
16 produtivo, resposta imune e resistência dos peixes a patógenos (Barton et al., 2000;  
17 Brandão et al., 2006; Harikrishnan et al., 2011).

18 Dado a ocorrência dessas inadequações de manejo e manutenção do meio de  
19 criação, é possível observar o surgimento de enfermidades com perdas produtivas  
20 ocasionadas pelo estresse a que os animais são expostos, comprometendo suas defesas  
21 imunológicas, uma vez que os organismos de potencial patogênico em diversos casos  
22 estão presentes na água como também no próprio animal (Tavechio et al., 2009; Souza,  
23 2010; Tavares-Dias, 2009; Macedo & Sipaubá-Tavares, 2010; Cyrino et al., 2010).

24 Dentre esses organismos a *Aeromonas hydrophila*, é uma bactéria associada a  
25 diversos casos de surgimento de enfermidades no meio produtivo (Ribeiro et al., 2016;  
26 Aoki, 1999; Monette et al., 2000). Os surtos de infecções dessa bactéria pode causar  
27 ulcerações do pedúnculo caudal, com posterior descamação cutânea com exposição de  
28 musculatura, hemorragia cutânea no corpo (Fig. 1) e nas nadadeiras (Aoki, 1999, Boijink  
29 & Brandão, 2001; Barcellos et al., 2008), com mortalidade dos animais afetados  
30 ocorrendo geralmente entre 2 e 10 dias do início dos sinais clínicos (Boijink & Brandão,

1 2001) e sua transmissão ocorre a partir das excretas dos peixes ou lesões da pele em  
2 contato com outros animais (Aoki, 1999).



3 Figura 1. A - Ulcerações cutâneas em piracanjuba – Fonte (Figueredo et al., 2014); B-  
4 Pontos hemorrágicos no abdômen de juvenil de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*)  
5 – Fonte pessoal.

6

7 Desse modo, com o intuito de controlar a proliferação de patógenos muitos  
8 produtores utilizam medicamentos sintéticos (Tavechio et al., 2009). Tais produtos  
9 aumentam os custos de produção e possuem alto potencial tóxico aos peixes, com possível  
10 contaminação da carne destinada ao mercado e da água que é liberada para o meio  
11 ambiente, ocasionando o surgimento de patógenos resistentes aos medicamentos pela  
12 frequente manipulação e consequente redução de eficiência (Brum et al., 2017; Tavares-  
13 Dias, 2009; Harikrishnan et al., 2011).

14 Com isso, é necessário considerar as perdas causadas por esses patógenos para a  
15 produção e das desvantagens do uso de medicamentos sintéticos, tornando viável e de  
16 suma importância a utilização de alternativas sustentáveis de controle e prevenção dessas  
17 enfermidades, que possuam menor potencial de contaminação da carne de consumo  
18 garantindo maior segurança alimentar, menor potencial tóxico para os animais e  
19 minimizar o impacto ambiental (Harikrishnan et al., 2011). Por esses fatores se torna  
20 importante a realização de pesquisas explorando e testando diferentes produtos e aditivos

1 alternativos, onde sua inclusão, tipo, quantidade e concentração pode variar dependente  
2 com a espécie do peixe, sistema e fase de criação (Brum et al., 2017; Ribeiro et al., 2016).

3

## 4 **1.2. Estresse em peixes**

5

6 Nos animais vertebrados incluindo os peixes, o estresse é uma resposta a um  
7 estímulo inerente à vida que influencia na homeostasia do organismo negativamente,  
8 onde, a partir da identificação, mensuração e intensidade dessa resposta é possível obter  
9 informações da capacidade dos peixes em resistir a morte e redefinir o seu padrão  
10 homeostático (Schreck & Tort, 2016).

11 Essa mensuração pode ser feita a partir de indicadores, que são usados como  
12 padrões para identificação do bem-estar animal. Alguns exemplos de indicadores são os  
13 metabólitos como a glicose que é associada a um conjunto de respostas secundárias que  
14 auxiliam o animal a se recuperar de um desafio e sobreviver pela mobilização da glicose  
15 armazenada (Barton, 2002; Sapolsky et al., 2000; Labarrère et al., 2013). Metabólitos  
16 podem ser mensurados a partir de amostras de sangue em equipamentos portáteis e são  
17 úteis para avaliar a resposta aguda dos peixes a estressores (Barton et al., 2002). Os níveis  
18 desses metabólitos também são afetados por processos metabólicos não relacionados ao  
19 estresse, sendo os resultados da linha de base de difícil interpretação, sendo mais úteis  
20 para medidas de respostas agudas a agentes estressores específicos (Sopinka et al., 2017).

21 Diversos hormônios também são indicadores de estresse em peixes, como o  
22 cortisol que é liberado após os primeiros estímulos do estresse, isso ocorre a partir do  
23 lançamento das catecolaminas, com a ativação do eixo hipotálamo hipófise-interrenal  
24 (HPI) como resposta ao estresse, que desencadeia a liberação de hormônios esteroides  
25 glicocorticóides como o cortisol, que uma vez na circulação sanguínea auxilia na  
26 mobilização da glicose armazenada influenciando a recuperação da homeostasia do  
27 animal (Koakoski et al., 2012; Koakoski et al., 2014).

28 Os leucócitos também exercem função de indicadores, estes compõem um grupo  
29 de células no sangue que desempenham uma função de defesa imunológica, divididos em  
30 cinco tipos na maioria dos vertebrados: basófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e  
31 neutrófilos (Sopinka et al., 2017) com concentrações no organismo variável, de acordo

1 com a presença e mecanismos de ação dos fatores causadores de estresse (Dhabhar et al.,  
2 1996).

3 Outro indicador é o hematócrito, que pode ser classificado como a porcentagem  
4 volumétrica de hemácias no sangue, medido pelo número de células compactadas através  
5 de centrifugação da amostra de sangue em tubo capilar, a concentração do hematócrito  
6 pode variar com a exposição do animal ao estresse, de acordo com o desafio empregado  
7 no peixe (Sopinka et al., 2017)

8

### 9 **1.3. Imunidade em peixes**

10

11 Quando exposto a situações de estresse, como na presença de patógenos o  
12 organismo dos animais demonstra incremento da atividade do sistema imune como  
13 resposta (Awad & Awaad, 2017), dito isso, de forma similar aos demais vertebrados os  
14 peixes apresentam dois componentes na resposta imune, a resposta inata ou não específica  
15 e a específica.

16 A resposta imune inata pode ser definida como a primeira barreira de defesa com  
17 função de impedir o acesso dos microrganismos patogênicos ao organismo do animal,  
18 como também eliminação dos mesmos (Bernstein et al., 1998). Essa resposta imune ainda  
19 pode ser dividida em duas categorias, sendo elas, a imunidade humoral e a imunidade  
20 mediada por células (Levison, 2016).

21 A imunidade humoral é aquela mediada por substâncias não específicas,  
22 compostas por glicoproteínas, principalmente, lisozima, interferon, proteína C reativa,  
23 transferrina, lectina e sistema complemento (Shoemaker et al., 2001; Biller-Takahashi &  
24 Urbinati, 2014), encontradas em fluidos corpóreos, como o muco, soro e ovos dos peixes  
25 que desempenham a função de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos.

26 Já a imunidade celular, é mediada por várias células de defesa, como os linfócitos  
27 trombóticos, monócitos, granulócitos (Neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células  
28 citotóxicas, que agem nos organismos patogênicos intracelulares, através da lise e  
29 eliminação dos mesmos (Secombes, 1996; Levinson, 2016).

30 Os trombócitos em peixes são células sanguíneas, com capacidade de fagocitose  
31 podendo ser hemostática e homeostática (Tavares-Dias et al., 2002), com função de

1 manter a integridade dos vasos sanguíneos e a rápida cessação do sangramento em caso  
2 de perda da integridade vascular, agindo também em processos inflamatórios a partir da  
3 coagulação sanguínea (Baldissera et al., 2018).

4 Os monócitos são umas das principais células do sistema imune dos peixes,  
5 importantes produtores de citocinas que possuem função de degradar diferentes tipos de  
6 patógenos, como também, função de fagocitose de antígenos, além de, interligar o sistema  
7 imune não específico ao específico (Shoemaker et al., 1997; Abarike et al., 2019). Essa  
8 fagocitose nos peixes ocorre a partir do englobamento dos componentes nocivos ao  
9 organismo, como material inerte e antigênico, assim como restos celulares da resposta  
10 inflamatória e de outros processos degenerativos (Ranzani-Paiva et al., 2013).

11 Já os neutrófilos estão envolvidos principalmente nos estágios iniciais da  
12 inflamação nos peixes (Manning, 1994). Como os monócitos, realizam fagocitose, porém,  
13 possuem outra importante função em infecções bacterianas que é a atividade microbicida  
14 que ocorre durante o processo de explosão respiratória, que consiste na conversão do  
15 oxigênio molecular em compostos e metabólitos derivados do oxigênio, como radicais  
16 livres do oxigênio (Biller & Takahashi, 2018).

17 Os eosinófilos e basófilos são geralmente encontrados em menores concentrações  
18 no sangue dos peixes (Tavares-Dias, 2009). A função dos basófilos de peixes não está  
19 definida e parece estar ligada a processos alérgicos, já que possuem histamina em seus  
20 grânulos (Thrall et al., 2007). Essas células também agem em processos de inflamação e  
21 na defesa celular mediante a degranulação.

22 A resposta imune específica ocorre dependente da atividade dos linfócitos B e T  
23 com função de produzir imunoglobulinas específicas, atividade citotóxica e  
24 imunomodulação via citocinas (Shoemaker et al., 2001). Em sua membrana celular, os  
25 linfócitos B possuem receptores específicos para os antígenos, que após a identificação  
26 destes se divide em plasmócitos e células de memória, produzindo anticorpos específicos  
27 para o patógeno (Secombes, 1996; Levinson, 2016). Já os linfócitos T apresentam  
28 capacidade de reconhecer os antígenos que se ligam aos marcadores de superfície de  
29 macrófago, promovendo assim sua proliferação (Levinson, 2016).

30

#### 1 **1.4. Ação dos Imunoestimulantes nos peixes**

2  
3 Uma das alternativas para controle e profilaxia dos agentes patogênicos e  
4 estressores são os aditivos naturais imunoestimulantes, uma vez que possuem menor  
5 toxicidade quando comparado aos sintéticos, menor risco de seleção de patógenos  
6 resistentes, maior potencial de biodegradação e são de fácil administração (Coimbra et  
7 al., 2006). Esses produtos são geralmente oferecidos por imersão no meio, injeção ou  
8 como suplemento na dieta, contribuindo na melhoria de desempenho produtivo e redução  
9 de estresse dos animais (Tavechio et al., 2009; Tavares-Dias, 2009). Auxiliando em uma  
10 resposta mais eficaz do sistema imune não-específico, como também, influenciando  
11 positivamente a resposta imune específica de peixes. Sendo assim, são capazes de  
12 aumentar a resistência do indivíduo a enfermidades, como os ocasionados por bactérias  
13 potencialmente patogênicas (Bricknell & Dalmo, 2005).

14 Esse incremento da ação do sistema imune pode ocorrer devido aos  
15 imunoestimulantes simularem ou fornecerem moléculas denominadas Pamps “Padrões  
16 moleculares associados a patógenos” (Biller-Takahashi & Urbinati, 2014). Essas  
17 moléculas contêm padrões moleculares encontrados em muitos patógenos que podem ser  
18 reconhecidos pelos receptores semelhantes a Toll (TLRs), presentes na parede celular de  
19 diversas células do sistema de defesa inato (Neutrófilos, linfócitos e monócitos). Por sua  
20 vez, esses receptores influenciam na ativação dos leucócitos e produção de moléculas  
21 como as citocinas que também agem na ativação dos leucócitos (Biller-Takahashi &  
22 Urbinati, 2014). Dessa forma, produtos imunoestimulantes promovem o aumento das  
23 taxas de fagocitose pelas células do sistema imune (Harikrishnan et al., 2011).

#### 24 **1.5. Aditivos imunoestimulantes**

25  
26 Diversos produtos têm ação comprovada sobre o funcionamento do sistema  
27 imunológico dos peixes, agindo como imunocapacitantes, esses produtos podem ser  
28 químicos como levamisol que é um composto com função anti-helmíntica em humanos e  
29 animais, porém em peixes estimula a atividade fagocitária (Barman et al., 2013). Também  
30 podem ser obtidos a partir de organismos vivos, como, MDP (Dipeptídeo de Muramil)  
31 obtido da mycobacterium (Kodama et al., 1993), LPS (Lipopolissacarídeos) obtidos da  
32 parede celular de bactérias gram-negativas, já sendo documentada sua eficácia na

1 prevenção da *Aeromonas hydrophila* e estimulação do sistema imune em truta-arco-íris  
2 (Barman et al., 2013; Nya & Austin, 2010), já o FCA (Adjuvante completo de Freund) é  
3 um óleo mineral adjuvante contendo *Mycobacterium butyricum* mortos que incrementam  
4 a imunidade, atividade respiratória fagocítica e atividade dos leucócitos (Barman et al.,  
5 2013).

6 Leveduras possuem componentes com potencial imunoestimulante, os glucanos,  
7 extraídos de polissacarídeos de cadeia longa do fermento, com função estimulatória dos  
8 mecanismos de defesa inespecíficos em peixes, como atividade fagocítica e proteção  
9 contra patógenos bacterianos (Barman et al., 2013). Certos polissacarídeos também são  
10 fonte de imunoestimulantes, como quitina e quitosana, apresentando estimulação dos  
11 macrófagos em peixes, como também, certos fatores nutricionais apresentam função  
12 equivalente como as vitaminas (C e E), assim como alguns hormônios, GH, prolactina e  
13 citosinas (Barman et al., 2013; Dawood et al., 2018; Mohan et al., 2019).

14 Os compostos obtidos a partir de plantas ou fitoterápicos, tem finalidade profilática  
15 e curativa (Brasil, 2011), demonstrando ampla atividade antiparasitária, antibacteriana e  
16 imunoestimulante (Silva & Fernandes Júnior, 2010; Hai, 2015; Dawood et al., 2018).  
17 Estes podem ser encontrados na forma de extrato, tintura, cera, óleos, exsudato, suco entre  
18 outros.

19 Dentre estes compostos, os óleos essenciais são extraídos de folhas, flores, caule,  
20 raízes e sementes proveniente do metabolismo secundário das plantas, constituindo um  
21 importante grupo de matérias-primas para comidas, produtos de higiene, perfumaria e  
22 indústria farmacêutica (Souza et al., 2019). Esses aditivos são misturas complexas de  
23 substâncias voláteis e lipofílicas e com baixo peso molecular (Morais, 2009). Podendo  
24 ser classificados como hidrocarbonetos terpenos, simples e terpenos álcoois, aldeídos,  
25 cetonas, fenóis, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos entre outros (Swamy  
26 et al., 2016; Souza et al., 2019).

27 A quantidade desses componentes nos óleos essenciais pode variar de 20 a 200  
28 sendo nomeados de acordo com sua concentração, divididos em: Principais constituintes  
29 (20 a 95%); Constituintes secundários (1 a 20%); Constituintes vestígio (abaixo de 1%)  
30 (Sticher, 2015; Souza et al., 2019). Devido a sua composição esse aditivo pode  
31 desempenhar função de promotor de crescimento, também já sendo demonstrado seu  
32 efeito imunomodulador, que acarreta no aumento da atividade fagocitária dos leucócitos

1    contra os patógenos e melhora na capacidade de absorção de nutrientes para os peixes,  
2    pelo possível aumento da palatabilidade das rações com óleos essenciais (Brum et al.,  
3    2017; Souza et al., 2019; Cunha et al., 2018).

4            Vários óleos de diferentes espécies de plantas são utilizados e já foram estudadas para  
5    tal finalidade, como o óleo essencial *Aloysia triphylla* com o terpenóide  $\beta$ -citral como  
6    principal constituinte, que após inclusão a dieta do *Rhamdia quelen* desafiados pela  
7    *Aeromonas hydrophila* proporcionou melhora na sobrevivência, redução da contagem de  
8    leucócitos, linfócitos e neutrófilos (Santos et al., 2017).

9            O óleo essencial *Mentha piperita* também já foi estudado, com o mentol um álcool  
10   terpênico como constituinte majoritário, auxiliando na manutenção da saúde e  
11   sobrevivência do *Colossoma macropomum* após 30 dias de alimentação e desafio por  
12   *Aeromonas hydrophila* (Ribeirto et al., 2016).

13           Em outro estudo, o óleo da *Mentha piperita* com o mentol como maior componente  
14   em sua composição, adicionado na ração para o *Oreochromis niloticus* durante 60 dias,  
15   ocasionou o incremento da ativação do sistema complemento, que possui papel  
16   fundamental na resposta imune inata (Valladão et al., 2017). Neste mesmo trabalho  
17   também foi avaliada a inclusão do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* na dieta dos  
18   peixes com o terpinen-4-ol compondo maior parte do óleo, de forma similar, os animais  
19   alimentados ração contendo o óleo apresentaram incremento na ativação do sistema  
20   complemento, além de, apresentaram maiores vilosidades intestinais que pode resultar no  
21   aumento da absorção de nutrientes.

22           O óleo essencial de *Citrus limon* com o terpenóide limoneno como principal  
23   componente, ofertado via dieta para o *Oreochromis mossambicus* com infecção pela  
24   *Edwardsiella tarda*, ocasionou melhora nos parâmetros da imunidade inata com redução  
25   da taxa de mortalidade dos peixes (Baba et al., 2016).

26           Óleo essencial de *Ocimum americanum* com o monoterpeno linalol em maior parte  
27   de sua composição adicionado a dieta do *Sciaenops ocellatus* durante 49 dias, aumentou  
28   a taxa de gordura intraperitoneal dos peixes, melhorando também a resposta  
29   imunomoduladora inata (Sutili et al., 2016).

30           O óleo essencial de *Ocimum gratissimum* com o monoterpenóide eucaliptol (1,8-  
31   cineole) como principal constituinte incluso na dieta de *Oreochromis niloticus*, após 55

1 dias de alimentação o óleo proporcionou incremento no crescimento dos animais, da  
2 resposta imune, resistência a infecção por *Streptococcus agalactiae* com aumento da  
3 sobrevivência (Brum et al., 2017).

4 De modo similar, o óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*) com o  
5 terpenóide geranial representando maior parte de sua composição, proporcionou o  
6 incremento da resposta imune e maior resistência ao *Streptococcus agalactiae* após  
7 inclusão na dieta do *Oreochromis niloticus* por 55 dias (Brum et al., 2017).

8 O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma herbácea utilizada com fins medicinais,  
9 diversas pesquisas científicas visam o isolamento e identificação dos princípios ativos do  
10 gengibre, bem como suas ações farmacológicas e seu potencial de utilização no  
11 tratamento de enfermidades (Ali et al., 2008). Grande parte dos seus componentes  
12 utilizados com tal finalidade está em seu rizoma que compõe a parte da planta que ocorre  
13 a extração do óleo essencial, como o citral um composto que possui propriedades  
14 antimicrobianas com potencial de uso como suplemento alimentar no tratamento de  
15 infecções em animais de produção (Yang et al., 2016). Outros componentes presentes no  
16 óleo como o neral, 1,8-cineol e canfeno também apresentam atividade imunoestimulante,  
17 antimicrobiana e antiparasitária (Ali et al., 2008; Brum, et al., 2017). Conhecido  
18 principalmente, por modular a resposta imune e proporcionar resistência a doenças, em  
19 humanos e animais, inclusive peixes (Shakya et al., 2015).

20

#### 21 **1.6. Biologia e aspectos produtivos do cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*)**

22

23 Entre as espécies nativas produzidas em pisciculturas, o cachara pertencente à  
24 ordem dos Siluriformes, família Pimelodidae e gênero *Pseudoplatystoma* (Tavares,  
25 1997). Que possui características como cabeça achatada, três pares de barbilhões  
26 próximos à boca, corpo roliço, alongado, dorso com cor cinza, ventralmente branca,  
27 apresentando bandas claras e escuras transversais perpendiculares ao corpo espaçadas  
28 entre si (Fig. 2).

29 Pode medir mais de 126 cm e faz parte do grupo dos peixes de couro (Kubitza,  
30 1998), só é encontrado em água doce, com ampla distribuição geográfica, habitando as  
31 principais bacias hidrográficas sul-americanas, como a Amazônia e do prata (Romagosa

1 et al., 2003) possui hábito alimentar carnívoro, principalmente piscívoro, apresentando  
2 atividade noturna (Campos, 2010).

3 Essa espécie possui expressivo potencial para a aquicultura demonstrando, bons  
4 índices produtivos, carne considerada nobre com um filé de qualidade com pequena  
5 quantidade de espinhas, aceitação de dietas industrializadas e possibilidade de produção  
6 em sistemas intensivos de cultivo como tanque-rede e viveiros escavados. O que  
7 potencializa a produção e comercialização desses animais e possibilita a redução do  
8 declínio dos estoques naturais devido a pesca extrativa (Kubitza, 1998; Coelho, 2005;  
9 Neto et al., 2010).



10 Figura 2. Exemplar de juvenil de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* (Arquivo  
11 pessoal).

12

## 13 2. OBJETIVO

14 Com este trabalho, o objetivo foi avaliar o efeito da inclusão do óleo essencial de  
15 gengibre *Zingiber officinale* na dieta sobre as variáveis hematoimunológicas de juvenis  
16 de cacharas submetidos a desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*.

17

18

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARIKE, E.D.; KUEBUTORNYE, F.K.; JIAN, J.; TANG, J.; LU, Y.; Cai, J. Influences of immunostimulants on phagocytes in cultured fish: a mini review. *Rev Aquacult*, v. 11, p. 1219-1227, 2019.
- ALI, B.H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M.O.; NEMMA, A. Some phytochemical, pharmacological, and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*): A review of recent research, *Food Chem. Toxicol.* v. 46, n.2, p. 409-420, 2008.
- AOKI, T. Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: WOO, P.T.K, BRUNO, D.W. *Fish Diseases and disorders*. Cab international, p.427-476, 1999.
- AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performace and immune status in fish. *Fish Shellfish Immun*, v. 67, p. 40-54, 2017.
- BABA, E.; ACAR, U.; ONTAS, C.; KESBICß, O. S.; YLMAZ, S. Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture*, v. 465, p. 13–18, 2016.
- BALDISSERA, M.D.; SOUZA, C.F.; VERDI, C.M.; VIZZOTTO, B.S.; SANTOS, R.C.V.; BALDISSEROTTO, B. *Aeromonas caviae* alters the activities of ectoenzymes that hydrolyze adenine nucleotides in fish thrombocytes. *Microbial Pathogenesis*, v. 115, p. 64-67, 2018.
- BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.dos.; MOTTA, A.C.da.; RITTER, F.; BEDIN, A.C.; SILVA, L.B.da. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: Aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. *B. Insta. Pesca.* v. 34, n.3, p. 355 – 363, 2008.
- BARMAN, D.; NEN, P.; MANDAL, S.; KUMAR, V. Immunostimulants for Aquaculture Health Management. *Journal of Marine Science Research and Development.* v. 3. 2013.
- BARTON, B.A.; BOLLING, H.; HAUSKINS, B.; JANSEN, C.R. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albuns*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. albuns x S. platyrhynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 126<sup>a</sup>, n.1, p.125-134. 2000.

- 1 BARTON, B. A., MORGAN, J. D., VIJAYAN, M. M. AND ADAMS, S. M.  
2 Physiological and condition related indicators of environmental stress in fish. In:  
3 Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress (ed. S. M. Adams), p. 111–148.  
4 Maryland: American Fisheries Society. 2002.
- 5
- 6 BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. Immunity. In: EVAS,  
7 D.H. (Ed.). The physiology of fishes. Boca Raton: CRC Press, 2 ed., p. 215-242,  
8 1998.
- 9
- 10 BILLER-TAKAHASHI, J.D.; URBINATI, E.C. Fish immunology. The modification and  
11 manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. Annals of the Brazilian  
12 Academy of Sciences. v. 86, n. 3, p. 1483-1495. 2014.
- 13
- 14 BILLER, J.D.; TAKAHASHI, L.S. Oxidative stress and fish immune system:  
15 phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *Anais da Academia Brasileira*  
16 *de Ciências*, v. 90, n. 4, p. 3403-3414, 2018.
- 17
- 18 BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Alterações histológicas e comportamentais  
19 provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em  
20 juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Ciência Rural*, v. 31, n. (4), p. 687-694, 2001.
- 21
- 22 BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C. Respostas de estresse em pirarucu  
23 (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, v.36,  
24 n.3, p.349-356, 2006.
- 25
- 26 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da  
27 Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa,  
28 126p. 2011
- 29
- 30 BRICKNELL, I., DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture.  
31 *Fish Shellfish Immunol.* v. 19, p. 457-472, 2005.
- 32
- 33 BRUM A, PEREIRA, S.A., OWATARI, M.S., CHAGAS, E.C., CHAVES, F.C.M.,  
34 MOURINO, J.L.P. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile  
35 tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*.  
36 *Aquaculture*, v. 468, p.235–243, 2017.
- 37
- 38 BRUM, A. PEREIRA, S.A.; CARDOSO, L.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.;  
39 MOURIÑO, J.L.P.; MARTINS, M.L. Blood biochemical parameters and

- 1 melanomacrophage centers in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger.  
2 *Fish & Shellfish Immunology*, v. 74, p. 444-449, 2018.
- 3
- 4 CAMPOS, J.L.O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix; Agassiz,  
5 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In. Bernardo  
6 Baldisserotto e Levy de Carvalho Gomes (Orgs.). Espécies nativas para piscicultura  
7 no Brasil. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2010. p. 335- 361.
- 8
- 9 COELHO, S.R.C. Produção intensiva de surubins híbridos em gaiolas: estudo de caso.  
10 2005. 84 fl. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz  
11 de Queiroz, Piracicaba, 2005.
- 12
- 13 COIMBRA, J.L.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S.; SOUZA, C.S.; RIBEIRO, F.L.B.  
14 Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. Pesquisa Agropecuária  
15 Brasileira, v. 41, n. 7, p. 1209-1211, 2006.
- 16
- 17 CUNHA, J. A.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. The effects of essential  
18 oils and their major compounds on fish bacterial pathogens – a review. *J. Appl.*  
19 *Microbiol.* v. 125, p. 328–344, 2018.
- 20
- 21 CYRINO, J.E.P.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K. A  
22 piscicultura e o ambiente – O uso de alimentos ambientalmente corretos em  
23 piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n. suppl spe, p.68-87, 2010.
- 24
- 25 DAWOOD, M.A.; KOSHIO, S.; ESTEBAN, M.Á. Beneficial roles of feed additives as  
26 immunostimulants in aquaculture: a review. *Rev Aquacult*, v. 10, p. 950-974, 2018.
- 27
- 28 DHABHAR, F.S.; MILLER, A.H.; MCEWEN, B.S.; SPENCER, R.L. Stress-induced  
29 changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *Journal*  
30 *of immunology*, v. 157, n. 4, p. 38-44, 1996.
- 31
- 32 FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018. The State of  
33 World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals.  
34 FAO, Rome.
- 35
- 36 FIGUEIREDO, H.C.P. Sanidade aquícola – Imunidade de animais aquáticos. Panorama  
37 da Aquicultura. Ed. 106, 2008.
- 38

- 1 FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.; COSTA, F.M.; MORAIS BARONY, G.; OLIVEIRA,  
2 T.; TAVARES, G. Sanidade em Organismos Aquáticos. 2014.
- 3
- 4 HAI, N.V. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review.  
5 *Aquaculture*, v. 446, p. 88-96, 2015.
- 6
- 7 HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM C.; HEO, M.S. Impact of plant products on  
8 innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*,  
9 v.317, n.1, p.1-15, 2011.
- 10
- 11 HOLMES, P.; NICCOLLS, L.M.; SARTORY, D.P. The ecology of  
12 mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. In AUSTIN, B.; ALTWEGG,  
13 M.; GOSLING, P.J.; JOSEPH, S. (ed.). *The genus Aeromonas*. John Wiley & Sons  
14 Ltd., West Sussex, England, p. 127-150, 1996.
- 15
- 16 JANDA, J.M.J.; ABBOTT, S.L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and  
17 infection. *Clin Microbiol.* v. 23, n.1, p. 35 – 73. 2010.
- 18
- 19 KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; M€ARZ, R.; SCHINDLER, G.; GRAEFE, E.U.;  
20 VEIT, M. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in  
21 animals and humans. *Planta Medica*, v. 66, p. 495–505, 2000.
- 22
- 23 KODAMA, H.; HIROTA, Y.; MUKAMOTO, M.; BABA, T.; AZUMA, I. Activation of  
24 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes by muramyl dipeptide. *Dev Comp*  
25 *Immunol.* v. 17, n. 2, p.129-140, 1993.
- 26
- 27 KAKOSKI, G.; OLIVEIRA, T.A.; ROSA, J.G.S.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L.C.;  
28 BARCELLOS, L.J.G. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of  
29 different ages. *Physiology & Behavior.* v. 106, n. 2. p. 129-132. 2012.
- 30
- 31 KAKOSKI, G.; QUEVEDO, R.M.; FERREIRA, D.; OLIVEIRA, T.A.; ROSA, J.G.S.;  
32 ABREU, M.S.; G, D.; MARQUEZE, A.; KREUTZ, L.C.; GIACOMINI, A.C.V.;  
33 FAGUNDES, M.; BARCELLOS, L.J.G. Agrichemicals chronically inhibit the  
34 cortisol response to stress in fish. *Chemosphere.* v. 112, p. 85-91, 2014.
- 35
- 36 KUBITZA, F.; CAMPOS, J.L.; BRUM, J.A. Produção Intensiva no Projeto Pacu Ltda.  
37 e Agropeixe Ltda. *Panorama da Aquicultura*, v.8, p.41-49, 1998.
- 38

- 1 LABARRERE, C. R.; FARIA, P.M.C de.; TEIXEIRA, E.AI.; MELO, M.M. Blood  
2 chemistry profile of Surubim hybrid fish (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *P.*  
3 *corruscans*) raised in different stocking densities. *Ciênc. agrotec.* [online], v.37, n.3,  
4 p. 251-258, 2013.
- 5
- 6 LEVINSON, W. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 13ed. Artmed: New York, 2016.
- 7
- 8 MACEDO, C. F; SIPAUBA-TAVARES, L. H. Eutrofização e qualidade da água na  
9 piscicultura: consequências e recomendações. *Bol. Inst. Pesca*. São Paulo, v. 36, n.2,  
10 p. 149-163, 2010.
- 11
- 12 MANNING, M.J. Fishes. In: TURNER (Ed.), *Immunology*. Chichester: John Wiley and  
13 Sons, p.69-100. 1994.
- 14
- 15 MOHAN, K.; RAVICHANDRAN, S.; MURALISANKAR, T.; UTHAVAKUMAR, V.;  
16 CHANDIRASEKAR, R.; SEEDEVI, P.; ABIRAMI, R.G.; RAJAN, D.K.  
17 Application of marine-derived polysaccharides as immunostimulants in aquaculture:  
18 A review of current knowledge and further perspectives. *Fish & Shellfish*  
19 *Immunology*, v. 86, p. 1177-1193, 2019.
- 20
- 21 MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos  
22 essenciais. *Horticultura Brasileira*, v. 27, p. 4050-4063, 2009.
- 23
- 24 MONETTE, S.A.D.; DALLAIRE, M.; MINGELBIER, D.; GROMAN, C.; UHLAND,  
25 J.P.; RICHARD, T.G.; PAILLARD, L.M.; JOHANNSON, D.P.; CHIVERS, H.W.;  
26 FERGUSON, F.A.; LEIGHTON, AND E. SIMKO. Massive mortality of common  
27 carp (*Cyprinus carpio carpio*) in the St. Lawrence River in 2001: diagnostic  
28 investigation and experimental induction of lymphocytic encephalitis. *Vet. Pathol.* v.  
29 43, p. 302-310, 2000.
- 30
- 31 MONTEIRO, P.C. Potencial antibacteriano dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*,  
32 *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* frente *Aeromonas hydrophila*, patógeno  
33 de tambaqui (*Colossoma macropomum*). 2019. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências  
34 Pesqueiras nos Trópicos) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM),  
35 2019.
- 36
- 37 NETO, L.A.M.; LIMA NASCIMENTO, F.; DELBEM, A.C.B.; GARBELINI, J.S.; de  
38 LARA, J.A.F. Rendimento Corporal do Cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*,  
39 Cultivado em Tanques-Rede com diferentes densidades de estocagem. 5º Simposio  
40 sobre recursos naturais e socioeconômicos do Pantanal. Corumbá - MS, 2010.

- 1  
2 NYA, E.J.; AUSTIN, B. Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an  
3 immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow  
4 trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Appl Microbiol. v. 108, n. 2, p. 686-694,  
5 2010.
- 6  
7 POTTINGER, T.G. The stress response fish: Mechanisms, effects and measurements.  
8 Fish Welfare (ed, E. J. Branson), p, 32-48. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2008.
- 9  
10 RANZANI-PAIVA, M.J.T.; de PÁDUA S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I.  
11 Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem; 2013. 140 p.
- 12  
13 RIBEIRO, S.C.; CASTELO, A.S.; SILVA, B.M.P.; CUNHA, A.S.; PROIETTI JÚNIOR,  
14 A.A.; OBA-YOSHIOKA, E.T. Hematological responses of tambaqui *Colossoma*  
15 *macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from  
16 *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. Acta  
17 Amazonica, v. 46, n.1, p.99 – 106, 2016.
- 18  
19 ROMAGOSA, E.; PAIVA, P. DE.; GODINHO, H.M.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.  
20 de. Características morfométricas e crescimento do cachara, *Pseudoplatystoma*  
21 *fasciatum* (Linnaeus, 1766), em cativeiro. Acta Scientiarum. Animal sciences, v. 25,  
22 p. 277 – 283. 2003.
- 23  
24 SANTOS, A. C., SUTILI, F. J., HEINZMANN, B. M., CUNHA, M. A., BRUSQUE, I.  
25 C. M., BALDISSEROTTO, B. *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver  
26 catfish diet: blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection.  
27 Fish Shellfish Immun. v. 62, p. 213–216, 2017.
- 28  
29 SILVA, N.C.C.; FERNANDES-JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a  
30 review of their antimicrobial activity. J Venom Anim Toxins Trop Dis. v. 16, n. 3, p. 402-  
31 13, 2010.
- 32  
33 SOPINKA, N. M.; DONALDSON, M. R.; O’CONNOR, C. M.; SUSKI, C. D.; COOKE,  
34 S. J. Stress indicators in fsh. In Fish Physiology (Vol. 35, p. 405–462). Academic  
35 Press, 2017.
- 36

- 1 SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence  
2 stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative  
3 actions 1. *Endocr. Rev.*, v.21, p. 55-89, 2000
- 4
- 5 SHAKYA, S.R. Medicinal uses of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) improves growth  
6 and enhances immunity in aquaculture. *International Journal of Chemical Studies*, v.  
7 3, n. 2, p. 83-87, 2015.
- 8
- 9 SCHRECK, C. B. AND TORT, L. The Concept of Stress in Fish. In *Fish Physiology -*  
10 *Biology of Stress in Fish*, Vol. 35 (eds. SCHRECK, C.B.; TORT, L.; FARRELL,  
11 A.P.; BRAUNER, C.J), San Diego, CA: Academic Press, 2016.
- 12
- 13 SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; PLUMB, J.A. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by  
14 macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of  
15 catfish. *Vet. Immunol. Immunopatho.*, v.58, p.181-190, 1997.
- 16
- 17 SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: Cellular defences. In: IWAMA, G.;  
18 NAKANISH, T. (Eds.), *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and*  
19 *Environment*. San Diego: Academic Press. P. 63-103. 1996.
- 20
- 21 SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; LIM, C. Immunity and disease resistance in fish.  
22 In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. (Eds.). *Nutrition and Fish Health*. Binghamton, NY  
23 USA: Haworth Press, p. 149-162, 2001.
- 24
- 25 SILVA, L.A.; MARTINS, M.A.; SANTO, F.E.; OLIVEIRA, F.C.; CHAVES, F.C.M.;  
26 CHAGAS, E.C.; MARTINS, M.L.; CAMPOS, C.M. Essential oils of *Ocimum*  
27 *gratissimum* and *Zingiber officinale* as anesthetics for the South American catfish  
28 *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Aquaculture*. v. 528, 2020.
- 29
- 30 SOUZA, A. A.; MARTINS, S. G. F.; POMPEU, P. S. Simulação dos efeitos de diferentes  
31 estratégias de pesca seletiva do surubim *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix &  
32 Agassiz, 1829) (Pisces: Pimelodidae). *Ecological Modelling*, Amsterdam, 2010.
- 33
- 34 SOUZA, C.F.; BALDISSERA, M.D.; BALDISSEROTTO, B.; HEIZMANN, B.M.;  
35 MARTOS-SITCHA, J.A.; MANCERA, J.M. Essential Oils as Stress-Reducing  
36 Agents for Fish Aquaculture: A Review. *Frontiers in Physiology*. v. 10, P. 785, 2019.
- 37
- 38 STICHER, O. "Ätherische Öle und Drogen, die ätherisches Öl enthalten," in *Sticker*  
39 *Pharmacognosie Phytopharmazie*, eds STICHER, O. HEILMANN J.; Zúndorf, I.;  
40 HÄNSEL I. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, P. 663– 740, 2015.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

SUTILI, F.J.; VELASQUEZ, A.; PINHEIRO, C.G.; HEINZMANN, B.M.; GATTIN, D.M.; BALDISSEROTTO, B. Evaluation of *Ocimum americanum* essential oil as an additive in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 56, p. 155-161, 2016.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. v.2016, 21 p, 2016.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G.; MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do Jundiá (*Rhamdia quelen*) (Pimelodidae). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n.4, p.693-698, 2002.

TAVARES-DIAS, M. Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Embrapa Amapá, 723p., 2009.

TAVARES, M. P. O surubim. In: MIRANDA, M. O. T. (Org.). *Surubim*. Belo Horizonte: IBAMA, 1997. p. 9-25. (IBAMA. Coleção meio ambiente; Série estudos pesca, 19).

TAVECHIO, W.L.V.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. *B. Inst. Pesca*, v.35, n.2, p.335 - 341, 2009.

THRALL M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1 Ed. São Paulo: Roca, 2007.

VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; PALA, G.; JESUS, R.B.; KOTZENT, S.; COSTA, J.C.; SILVA, T.F.A.; PILARSKI, F. Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquaculture Research*, v. 48, n. 11, p. 5640-5649, 2017.

YANG, Y.; WANG, Q.; DIARRA, M.S.; YU, H.; HUA, Y.; GONG, J. Functional assessment of encapsulated citral for controlling necrotic enteritis in broiler chickens. *Poult. Sci.* v. 95, n. 4, p. 780–789, 2016.

1 **Resposta hemato-imunológica de cacharas alimentados com dietas contendo óleo**  
2 **essencial de gengibre e submetidos a desafio com *Aeromonas hydrophila***

3

4

5 **Resumo**

6 Os produtos extraídos de plantas são uma alternativa aos produtos sintéticos no  
7 incremento de desempenho e resistência a doenças nos peixes. O objetivo do trabalho foi  
8 avaliar o efeito da inclusão dietética do óleo essencial de gengibre sobre as variáveis  
9 hematológicas e imunes de juvenis de cacharas *Pseudoplatystoma reticulatum* após 65  
10 dias de alimentação, após serem submetidos a um estresse induzido e desafiados com  
11 *Aeromonas hydrophila*. Na pesquisa foram realizados dois ensaios, no primeiro foram  
12 utilizados 108 cacharas de  $40,23 \pm 17,38$  g e  $18,59 \pm 2,78$  cm, distribuídos aleatoriamente  
13 em 12 tanques. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído  
14 por quatro níveis de inclusão de óleo essencial de gengibre, 0%, 0,5%, 1,0% e 1,5% com  
15 três repetições cada. Ao final do período experimental (65 dias) foi realizada a colheita  
16 sanguínea de dois animais por tanque para contagem de eritrócitos, hemoglobina,  
17 microhematócrito, VCM, CHCM, glicose, contagem total de leucócitos, trombócitos,  
18 atividade respiratória de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos. Todos os dados  
19 foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade, quando confirmadas, foram  
20 submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias. No  
21 segundo ensaio, com os peixes suplementados com o óleo essencial de gengibre na dieta  
22 foi realizado estresse induzido com posterior seleção de mais dois peixes para colheita e  
23 análise sanguínea (0-Estresse), com os demais juvenis, sendo desafiados com *Aeromonas*  
24 *hydrophila*. Decorrido 24 horas do desafio foram realizadas colheitas sanguíneas. Os  
25 dados provenientes do segundo ensaio foram submetidos à análise de variância em  
26 esquema fatorial 4x2 (4 dietas e 2 tempos de coleta 0-Estresse e 24 h), e teste de Tukey.  
27 Não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) para as variáveis hematológicas e imunológicas  
28 com exceção da glicose, contagem total de leucócitos e trombócitos dos cacharas  
29 alimentados com dieta suplementada com o óleo essencial durante 65 dias. Foi observada  
30 interação entre o tempo 24 horas e tratamentos para o hematócrito com 16,50; 31,00;  
31 43,33 e 35,50% nos tratamentos 0,0%; 0,5%; 1,0% e 1,5% respectivamente, não houve  
32 diferença significativa entre os tratamentos com alguma inclusão do óleo. Para os  
33 tratamentos com inclusão do óleo essencial foi observado diferença ( $p < 0,05$ ) na  
34 proporção de monócitos entre os tempos, com redução após 24 horas do desafio. A  
35 inclusão dietética do óleo essencial de gengibre durante 65 dias não influenciou nas  
36 variáveis hematológicas e imunológicas dos juvenis de cachara. Entretanto, após estresse  
37 induzido e desafio por *Aeromonas hydrophila* os peixes alimentados com 0,5% do óleo  
38 não demonstraram redução nos valores do hematócrito permanecendo na faixa normal da  
39 espécie diferindo do tratamento 0%, apresentando também uma possível maior  
40 mobilização de monócitos da corrente sanguínea para as áreas afetadas pelo patógeno.

41 *Palavras-chave:* Desafio bacteriano, fitoterápico, imunoestimulante, parâmetros  
42 hematológicos.

43

44

## 1 Abstract

2 Products extracted from plants are an alternative to synthetic products in increasing  
3 performance and resistance to diseases in fish. The objective of the study was evaluate  
4 the effect of the dietary inclusion of ginger essential oil on the hematological and immune  
5 variables of juveniles of *Pseudoplatystoma reticulatum* after 65 days of feeding, and after  
6 being subjected to stress induced and challenged with *Aeromonas hydrophila*. Two tests  
7 were carried out in the research, for the first were used 108 cacharas with  $40.23 \pm 17.38$   
8 g and  $18.59 \pm 2.78$  cm were used, randomly distributed in 12 tanks. The experimental  
9 design was completely randomized, consisting of four levels of inclusion of essential oil  
10 of ginger, 0%, 0.5%, 1.0% and 1.5% of oil inclusion with three replicates each, allocating  
11 nine animals per tank. At the end of the experimental period (65 days) blood was collected  
12 from two animals per tank to count red blood cells, hemoglobin, microhematocrit,  
13 average corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, glucose, total  
14 leukocyte count, thrombocytes, leukocyte respiratory activity and differential leukocyte  
15 count. All data were evaluated for normality and homogeneity, when confirmed, they  
16 were subjected to analysis of variance and Tukey's test for comparison of means. In the  
17 second test, with the fish supplemented with the essential oil of ginger in the diet, induced  
18 stress was performed with subsequent selection of two more fish for collection and blood  
19 analysis (0-Stress), with the other juveniles, being challenged with *Aeromonas*  
20 *hydrophila*. After 24 hours of the challenge, blood samples were taken. The data from the  
21 second test were subjected to analysis of variance in a 4x2 factorial scheme (4 diets and  
22 2 collection times 0-Stress and 24 h), and Tukey test. No difference was observed ( $p >$   
23 0.05) for hematological and immunological variables, except for the glucose, total count  
24 of leukocytes and thrombocytes from cacharas fed with a diet supplemented with essential  
25 oil for 65 days. An interaction was observed between the time 24 hours and treatments  
26 for hematocrit at 16.50; 31.00; 43.33 and 35.50% in the 0.0% treatments; 0.5%; 1.0% and  
27 1.5% respectively, there was no significant difference between treatments with some  
28 inclusion of the oil. For treatments with the inclusion of essential oil, a difference ( $p$   
29  $< 0.05$ ) was observed in the proportion of monocytes between the times, with a reduction  
30 after 24 hours of the challenge. The dietary inclusion of ginger essential oil for 65 days  
31 did not influence the hematological and immunological variables of cachara juveniles.  
32 However, after induced stress and challenge by *Aeromonas hydrophila*, fishes fed 0.5%  
33 of the oil did not show a reduction in the hematocrit values, remaining in the normal range  
34 of the species, differing from the 0% treatment, also showing a possible greater  
35 mobilization of monocytes in the bloodstream for areas affected by the pathogen.

36 *Keywords:* Bacterial challenge, Phytotherapy, immunostimulant, hematological  
37 parameters.

38

39

40

41

42

43

## 1. Introdução

Nos diversos sistemas de produção, infecções bacterianas podem causar mortalidade massiva dos peixes acarretando prejuízo aos produtores (Boijink e Brandão, 2001). Com o intuito de controlar a proliferação desses patógenos são utilizados antibióticos sintéticos (Tavechio et al., 2009), contudo esses produtos podem elevar os custos de produção, contaminar a carne destinada ao mercado, a água que é liberada para o meio ambiente e se mal administrados têm alto potencial tóxico podendo provocar o surgimento de patógenos resistentes aos medicamentos (Brum, et al., 2017; Tavares-Dias, 2009; Harikrishnan et al., 2011).

Considerando esse cenário, é importante buscar alternativas sustentáveis de profilaxia e controle dessas enfermidades, que possuam menor potencial de contaminação, garantam maior segurança alimentar, menor toxicidade para os peixes e minimizem o impacto ambiental (Harikrishnan et al., 2011). Uma das possíveis alternativas são os aditivos naturais imunostimulantes, uma vez que possuem menor toxicidade, maiores índices de biodegradação e são de fácil administração (Coimbra et al., 2006; Ferreira et al., 2019; Costa et al., 2020), contribuindo no incremento de desempenho produtivo, modulação do sistema imune e redução de estresse dos animais (Tavechio et al., 2009; Tavares-Dias, 2009).

Dos compostos extraídos a partir de plantas, os óleos essenciais são aditivos com efeitos conhecidos em diversas espécies de peixes e quando suplementado nas dietas podem influenciar positivamente no desempenho produtivo funcionando como um promotor de crescimento além de influenciar na palatabilidade da dieta (Harikrishnan et al., 201; Shakya et al., 2015).

Óleos essenciais possuem efeito associado a modulação do sistema imune que pode levar a melhorias no desempenho zootécnico funcionando como um promotor de crescimento e também imunostimulante, que acarreta no aumento da atividade fagocitária dos leucócitos contra os patógenos e melhoria na capacidade de absorção de nutrientes para os peixes, pelo possível aumento da palatabilidade das rações com óleos essenciais, como já evidenciado para a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Brum et al., 2017), esturjão *Huso huso* (Vahedi et al., 2017), perca *Lates calcarifer* (Talpur, 2014) e tambaqui *Collossoma macropomum* (Ribeiro et al., 2016).

1 Entre as plantas utilizadas para obtenção desses óleos, o gengibre possui no seu  
2 rizoma diversos componentes como o citral, neral, 1,8-cineol e canfeno que apresentam  
3 atividade imunoestimulante, antimicrobiana, antiparasitária (Ali et al., 2008), conhecido  
4 principalmente, por modular a resposta imune e proporcionar resistência a doenças, em  
5 humanos e animais, inclusive peixes (Shakya et al., 2015; Ribeiro et al., 2016; Brum et  
6 al., 2017).

7 Dentre as espécies de peixe com possibilidade de potencial produtivo e aceitação  
8 dos óleos essenciais na dieta, são escassos ou inexistentes trabalhos publicados com óleo  
9 essencial de gengibre na dieta do cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) sendo este o  
10 primeiro trabalho avaliando seu efeito imunoestimulante no peixe, porém o óleo já foi  
11 testado como anestésico para o mesmo (Silva et al., 2010). Essa espécie apresenta bons  
12 índices de desempenho zootécnico, características organolépticas e possibilidade de  
13 produção em diferentes tipos de cultivo como tanque-rede e viveiros escavados (Campos,  
14 2003; Fantini et al., 2017).

15 O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão dietética do óleo essencial  
16 de gengibre sobre as variáveis hematoimunológicas de juvenis de cacharas  
17 *Pseudoplatystoma reticulatum* após 65 dias de alimentação, sendo também, submetidos  
18 a um estresse induzido e desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

19

## 20 **2. Material e Métodos**

21

### 22 **2.1. Peixes, condições e dietas experimentais**

23

24 Foram utilizados 108 juvenis de cachara de comprimento total  $18,59 \pm 2,78$  cm e  
25 peso médio  $40,23 \pm 17,38$  g no início do período experimental, todos os peixes passaram  
26 por treinamento alimentar para aceitar a ração. Os cacharas foram distribuídos em 12  
27 tanques de polietileno com volume útil de 80 L, totalizando 9 peixes por tanque. Os  
28 tanques possuíam sistema com fluxo contínuo de água com renovação do volume total a  
29 cada 24 horas, aeração constante, termostatos regulados a 28 °C e fotoperíodo de 12 horas  
30 claro e 12 horas escuro.

31 Os primeiros sete dias após transferência os peixes foram alimentados com 5%  
32 da biomassa com ração comercial extrusada (Nanolis®, Brasil), granulometria média de

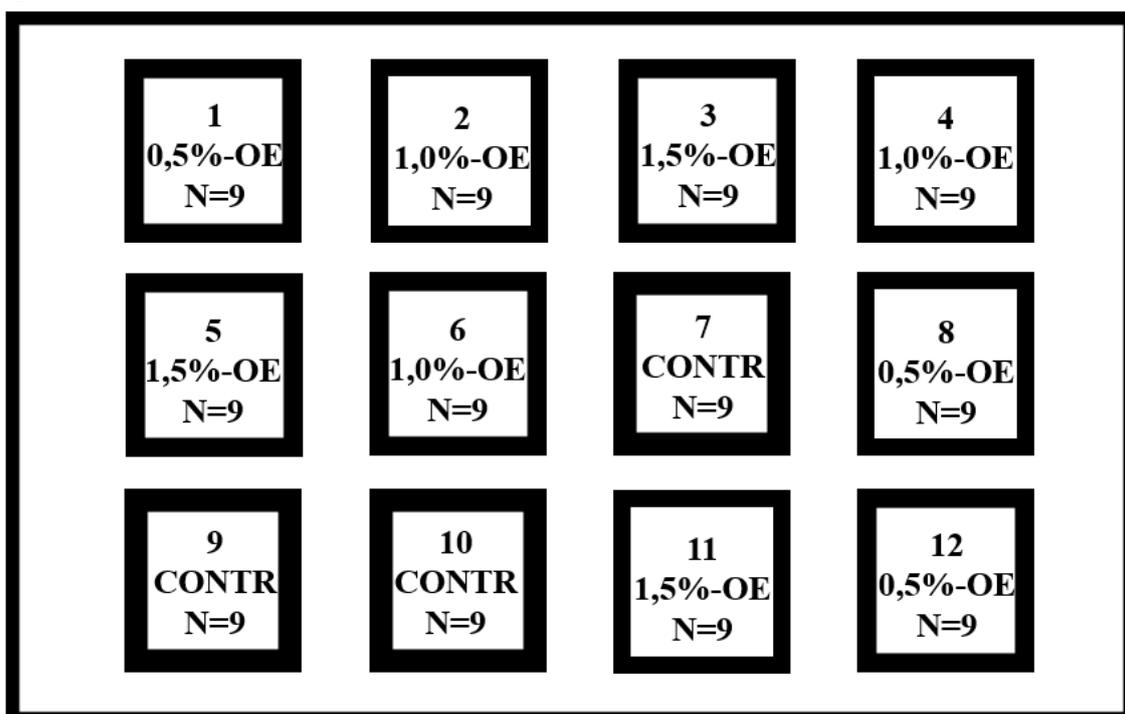
1 2 mm (Valores: 45% Proteína bruta - mínimo, 9% Extrato etéreo – máximo, 15% Material  
 2 mineral – máximo, 4% Fibra bruta – máximo, 20 g kg<sup>-1</sup> Cálcio – mínimo, 10 g kg<sup>-1</sup>  
 3 Fósforo – mínimo, 1000 mg kg<sup>-1</sup> Vitamina C – mínimo e 300 mg kg<sup>-1</sup> Vitamina E –  
 4 mínimo) duas vezes ao dia.

5

## 6 2.2. Delineamento experimental

7

8 O estudo foi realizado em dois ensaios distintos, o primeiro com duração de 65  
 9 dias, os animais receberam as mesmas rações do período de aclimação e regime  
 10 alimentar, mas com inclusão do óleo essencial de gengibre (Fig. 3). No segundo ensaio  
 11 foi realizado um estresse induzido nos juvenis de cachara submetidos as dietas  
 12 experimentais e desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*, com avaliação 24 horas  
 13 após o desafio.



**0,5%-OE= Inclusão de 0,5% de óleo essencial de gengibre na ração.**

**1,0%-OE= Inclusão de 1,0% de óleo essencial de gengibre na ração.**

**1,5%-OE= Inclusão de 1,5% de óleo essencial de gengibre na ração.**

**CONTR= Inclusão de 0,0% de óleo essencial de gengibre na ração.**

14 Fig. 3 – Delineamento experimental.

15

### 2.2.1 Primeiro ensaio experimental

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado e os tratamentos foram constituídos pelas seguintes dietas: controle - 0,0% de inclusão de óleo essencial de gengibre, 0,5%; 1,0% e 1,5% de inclusão de óleo essencial de gengibre com três repetições para cada tratamento.

A preparação das dietas suplementadas foi realizada de acordo com Dairiki et al. (2013), usando álcool de cereais (CereAlcool®, Brasil) como veículo e diluente para incorporação do óleo nas rações. Para cada quilograma de ração foi aspergida uma solução de 100g do álcool de cereais e a concentração desejada do óleo essencial, com recobrimento total dos grânulos garantindo boa incorporação. Na ração controle apenas o álcool de cereais foi aspergido. As rações foram secas a 25°C por 24 horas, embaladas em sacos plásticos e armazenadas a -4°C. Essas dietas foram preparadas semanalmente, no intuito de evitar a perda do óleo ou alteração da concentração por maiores períodos de armazenamento.

Foram realizadas biometrias em intervalos de quatro semanas de todos os peixes de cada tanque para ajuste da quantidade de ração fornecida. Para manejo, os cacharas foram anestesiados com 50 mg L<sup>-1</sup> de eugenol, com finalidade de minimizar o estresse causado pelo procedimento. Diariamente foram mensurados os parâmetros de qualidade de água: temperatura, oxigênio e pH, no período da manhã (08:00h) e tarde (16:00h).

Após os 65 dias de alimentação foram colhidas amostras de sangue de dois peixes por tanque, para avaliação das variáveis hematológicas e imunológicas dos cacharas. Os peixes amostrados para colheita não retornaram para as unidades experimentais.

### 2.2.2 Segundo ensaio experimental

Dos peixes suplementados no primeiro ensaio, sete foram utilizados para a realização do segundo ensaio experimental, que consistiu em estressar por perseguição, captura e exposição ao ar por 3 minutos e desafiar os peixes com bactéria. Após 30 minutos do estresse induzido (Tempo 0-Estresse), foram colhidas amostras de sangue de dois peixes de cada tanque, escolhidos aleatoriamente, totalizando seis peixes por

1 tratamento, para avaliação das variáveis hematológicas e imunológicas. Os peixes  
2 amostrados para colheita sanguínea não retornaram para os tanques.

3 Os demais juvenis foram submetidos ao desafio por *Aeromonas hydrophila*,  
4 inoculadas intraperitonealmente, na concentração de  $0,34 \times 10^6$  UFC, determinada após  
5 teste da DL50, que consiste na concentração de bactéria que leva a mortalidade de 50%  
6 do grupo de animais avaliados após 24 horas. Decorrido 24 horas de exposição desses  
7 peixes a bactéria (Tempo 24 horas), foram realizadas colheitas sanguíneas, em três peixes  
8 por tratamento, a fim de analisar os parâmetros hematológicos e imunológicos.

9 A partir dos procedimentos de colheita sanguínea dos peixes em tempos diferentes  
10 foi estabelecido um delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial  $4 \times 2$ ,  
11 sendo quatro tratamentos (0,0% - controle; 0,5%; 1,0% e 1,5%) x dois tempos de  
12 amostragem (0-Estresse e 24 h após a infecção).

13

### 14 2.3. Preparo da bactéria e desafio bacteriano

15

16 *Aeromonas hydrophila* (KJ561021 LAPOA) foi cultivada em tubos falcon  
17 alocados em câmara de germinação, após 24 horas a cepa bacteriana foi transferida para  
18 erlenmeyers com ágar, e estimulado seu crescimento. O meio então foi diluído em tampão  
19 fostato-salino (PBS) e homogeneizado para quantificação da concentração de bactérias  
20 desejada de  $0,34 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC), determinada a partir de  
21 alíquotas de amostras em espectrofotômetro (Femto – Cirrus 80). Logo após, as amostras  
22 foram centrifugadas e retirado o sobrenadante para preenchimento do volume com PBS.  
23 Posteriormente a solução foi transferida para seringas estéreis. Os juvenis de cachara  
24 foram inoculados intraperitonealmente com 1 mL de solução de *Aeromonas hydrophila*  
25 cada.

26

### 27 2.4. Colheita sanguínea e análises hemato-imunológicas

28

29 Para as colheitas sanguíneas foram utilizadas seringas e agulhas descartáveis  
30 banhadas em EDTA à 3% com a punção sanguínea realizada na região caudal dos peixes  
31 próxima a linha lateral. Foram avaliados: Glicose (Gl) – mensurada utilizando o  
32 equipamento Accu-Chek performa com o resultado expresso em mg/dL; Porcentagem de

1 hematócrito (Ht) - determinado pelo método de microhematócrito de Goldenfarb et al.  
 2 (1971); Hemoglobina (Hb) - Determinada pelo método de cianometahemoglobina de  
 3 Collier (1944); Contagem do número de eritrócitos (Er) - Em câmara de Neubauer  
 4 utilizando a diluição de 1:200 em solução de formol-citrato em microscópio óptico (400  
 5 X).

6 A partir dos dados de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos foram  
 7 calculados os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM) =  $Ht \times 10/Er$ ; e  
 8 concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) =  $Hb \times 100/Ht$ .

9 Para a contagem diferencial de leucócitos, contagem total de trombócitos e  
 10 leucócitos foram confeccionadas extensões sanguíneas em duplicata de cada animal,  
 11 secas ao ar e coradas pancromicamente com May Grünwald-Giemsa-Wright de acordo  
 12 com (Tavares-Dias & Moraes, 2003).

13 A análise da atividade respiratória dos leucócitos – Burst Respiratório - segundo  
 14 Biller (2008), foi determinada por meio de ensaio colorimétrico baseado na redução do  
 15 corante nitrobluetetrazolium (NBT), que dá origem a precipitados. Para determinar a  
 16 quantidade do precipitado, 50  $\mu$ L de sangue heparinizado foi adicionado a 50  $\mu$ L de NBT,  
 17 esta mistura foi homogeneizada e incubada. Logo após, 50  $\mu$ L da mistura foi diluída em  
 18 1 ml de Ndimetilformamida (DMF), com centrifugação e mensuração da densidade óptica  
 19 da solução.

20

## 21 2.5. Composição do óleo essencial

22

23 O óleo essencial utilizado neste estudo foi obtido da extração por hidrodestilação  
 24 com aparelho Clevenger dos rizomas de gengibre e a sua composição química (Tabela 1)  
 25 foi determinada por cromatografia gasosa e espectrofotômetro de massa, realizado no  
 26 Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da Embrapa Amazônia Ocidental,  
 27 Manaus, Brasil.

**Tabela 1.** Composição química do óleo essencial de *Zingiber officinale*.

Pico	Constituintes	Teor (%)
1	2-heptanol	0,6
2	Triciclono	0,2
3	$\alpha$ -pineno	3,2

4	Canfeno	8,5
5	Sabineno	0,2
6	$\beta$ -pineno	0,4
7	6-metil-5-hepten-2-ona	1,1
8	Mirceno	2,4
9	$\alpha$ -felandreno	0,5
10	$\beta$ -felandreno	9,9
11	1,8-cineol	4,4
12	Terpinoleno	0,3
13	Linalol	1
14	Citronelol	0,2
15	Borneol	0,9
16	$\alpha$ -terpineol	0,7
17	Citronelol	0,9
19	Geraniol	0,8
20	Citral	16,0
21	$\alpha$ -copaeno	0,4
22	<i>allo</i> -aromadendreno	0,7
23	$\gamma$ -gurjuneno	0,4
25	<i>ar</i> -curcumeno	3,8
26	$\beta$ -eudesmol	0,1
27	$\alpha$ -zingibereno	20,4
28	(E.E)- $\alpha$ -farneseno	0,3
30	7-epi- $\alpha$ -selineno	0,2
31	$\beta$ -sesquifelandreno	7,2
32	(E)- $\gamma$ -bisaboleno	0,2
33	Elemol	0,2
34	Germacreno	12,5
35	n.i.	1,3

1 n.i. = não identificado.

2

### 3 2.6. Análise estatística e ética na pesquisa

4

5 Para o primeiro ensaio todos os dados foram avaliados quanto à normalidade  
6 utilizando o teste de Shapiro Wilk e homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett.  
7 Sendo confirmada a distribuição normal e a homogeneidade das variâncias, os dados  
8 foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias.

9 Na segunda fase os dados foram avaliados quanto à normalidade utilizando o teste  
10 de Shapiro Wilk e homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Confirmada a  
11 distribuição normal e a homogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos à  
12 análise de variância em esquema fatorial 4x2 (4 dietas e 2 tempos de coleta 0-Estresse e

1 24 h), e teste de Tukey para observar as diferenças significativas e o desdobramento da  
2 interação do tratamento e tempo de amostragem. Quando observada tal interação nas  
3 variáveis, estas foram apresentadas em forma de gráficos, com as demais variáveis  
4 apresentadas em forma de tabela.

5 Todas as análises foram realizadas no programa estatístico R, adotando o nível de  
6 significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

7 Esse trabalho foi autorizado pelo comitê de ética no uso de animais – CEUA, da  
8 Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) sob o protocolo número 003/2018  
9 e realizado no Laboratório de Sanidade de Peixes, no Setor de Piscicultura da UEMS,  
10 Unidade Universitária de Aquidauana.

11

### 12 **3. Resultados**

13

#### 14 **3.1. Primeiro ensaio experimental**

15

16 Após os 65 dias de alimentação com as dietas experimentais, não foram  
17 observadas diferenças ( $p > 0,05$ ) para os eritrócitos e hematócrito (Tabela 2). Da mesma  
18 forma, a hemoglobina com menor média para o tratamento 1,50%, no entanto sem  
19 variação ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2). Isso também foi observado na avaliação do VCM e CHCM  
20 (Tabela 1).

21 Na análise da atividade respiratória de leucócitos (ARL) não foram observadas  
22 diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes níveis de inclusão do óleo essencial de gengibre  
23 (Tabela 2). Assim como para as contagens de linfócitos, monócitos, neutrófilos e  
24 basófilos com valores médios entre 9,50 a 5,12; 0,92 a 0,52; 1,54 a 1,41 e 0,50 a 0,26  
25  $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 2).

26 Na glicose (Fig. 4) foi observada diferença ( $p < 0,05$ ), o tratamento 0,5%  
27 apresentou a menor concentração de glicose no sague quando comparado ao 1,50%, não  
28 diferindo dos demais tratamentos, enquanto o tratamento 1,50% não diferiu do 0,0% e  
29 1,0%.

30 O total de leucócitos (Fig. 5A) apresentou diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos  
31 após os 65 dias de alimentação, o tratamento 0,5% apresentou a menor quantidade de

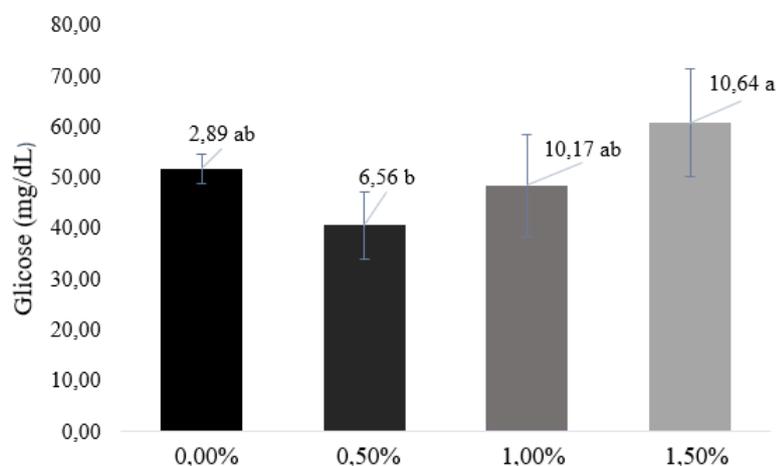
1 leucócitos quando comparado ao 0,0%, não diferindo dos demais tratamentos. Para os  
 2 trombócitos (Fig. 4B), o tratamento 0,5% mostrou diferença estatística em relação aos  
 3 demais, apresentando o maior número de trombócitos.

4

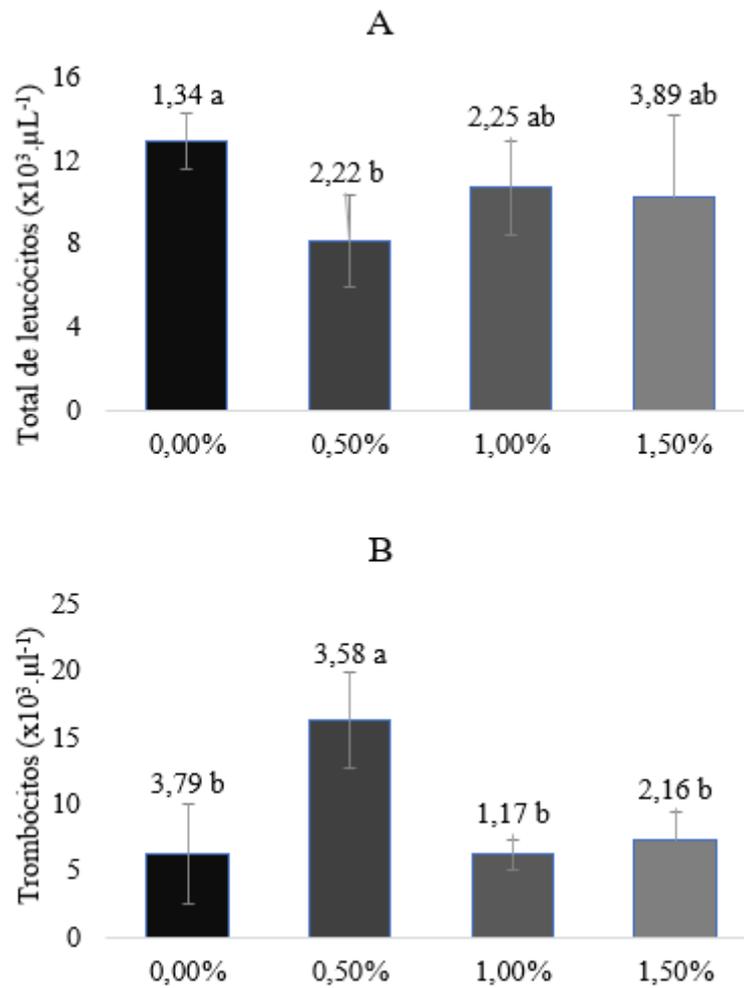
5 **Tabela 2.** Parâmetros hemato-imunológicos (média  $\pm$  desvio padrão) de cacharas (peso médio=  
 6  $65,94 \pm 27,17$  g) após 65 dias de alimentação com inclusão dietética de óleo essencial de gengibre  
 7 (*Zingiber officinale* rosc.) em diferentes concentrações. VCM= Volume corpuscular médio,  
 8 CHCM= Concentração de hemoglobina corpuscular média, ARL= Atividade respiratória dos  
 9 leucócitos. n= 9 peixes por tratamento.

Parâmetros	concentrações de óleo essencial de gengibre			
	0,00% (n=9)	0,50% (n=9)	1,00% (n=9)	1,50% (n=9)
Eritrócitos ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	$3,58 \pm 0,41$	$3,51 \pm 0,74$	$3,83 \pm 0,58$	$4,41 \pm 0,16$
Hematócrito (%)	$71,25 \pm 4,97$	$58,75 \pm 7,01$	$68,00 \pm 10,43$	$59,33 \pm 5,25$
Hemoglobina (g.dL <sup>-1</sup> )	$9,44 \pm 3,37$	$9,26 \pm 3,38$	$10,9 \pm 4,84$	$6,67 \pm 5,22$
VCM (fL)	$201,80 \pm 16,99$	$158,38 \pm 42,75$	$176,38 \pm 33,79$	$133,33 \pm 11,69$
CHCM (g.dL <sup>-1</sup> )	$13,81 \pm 4,08$	$13,20 \pm 5,77$	$16,74 \pm 7,23$	$9,39 \pm 2,41$
ARL	$0,14 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,06$	$0,15 \pm 0,05$
Linfócitos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	$9,50 \pm 0,90$	$5,12 \pm 1,01$	$6,46 \pm 1,29$	$6,80 \pm 1,00$
Monócitos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	$0,59 \pm 0,28$	$0,59 \pm 0,43$	$0,92 \pm 0,36$	$0,52 \pm 0,19$
Neutrófilos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	$1,45 \pm 0,23$	$1,54 \pm 0,50$	$1,41 \pm 0,65$	$1,47 \pm 0,32$
Basófilos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	$0,42 \pm 0,15$	$0,26 \pm 0,17$	$0,43 \pm 0,32$	$0,50 \pm 0,23$

10 Não houve diferenças estatísticas entre as variáveis ( $P > 0,05$ ).



11 Figura 4. Glicose de juvenis de cacharas alimentados por 65 dias com dietas contendo  
 12 diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (0,0%; 0,5%; 1,0%; 1,5%), n= 9  
 13 peixes por tratamento.



1

2 Figura 5. Total de leucócitos (A) e trombócitos (B) de juvenis de cacharas alimentados  
3 por 65 dias com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre  
4 (0,0%; 0,5%; 1,0%; 1,5%), n= 9 peixes por tratamento.

5

6

7

8

9

10

11

12

### 3.2. Segundo ensaio experimental

Na análise dos resultados decorrentes das colheitas sanguíneas após o estresse induzido (0-Estresse) e 24 horas após o desafio bacteriano, não foram observadas diferenças ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos para o número de eritrócitos, hemoglobina, VCM, CHCM, ARL, linfócitos e neutrófilos.

Já na glicose foram observadas diferenças ( $p<0,05$ ) (Tabela 3) quando comparados os diferentes tempos de colheita sanguínea, sendo evidenciado uma redução drástica da glicose no sangue após 24 horas do desafio bacteriano, já entre os tratamentos não houve diferenças estatísticas.

Para os leucócitos totais foram observadas diferenças estatísticas ( $p<0,05$ ) (Tabela 3) nos diferentes momentos de colheita sanguínea, sendo evidenciado uma redução dos linfócitos no sangue após 24 horas do desafio bacteriano, porém, não foram observadas diferenças entre os tratamentos. A mesma diferença foi observada para a contagem de trombócitos entre os tempos de colheita, no entanto, após 24 horas do desafio, o tratamento 1,5% apresentou maior contagem de trombócitos, quando comparado aos demais, que não diferiram entre si.

Para os basófilos foi observada diferença ( $p<0,05$ ) entre os tempos somente para o tratamento 0,0%, com redução dos basófilos no sangue após 24 horas do desafio. Quanto a comparação dos tratamentos, no tempo 0-Estresse os peixes dos tratamentos 0,0% e 1,0% demonstraram maior número de basófilos não diferindo entre si, em relação aos tratamentos 0,5% e 1,5%.

Na relação de interação de cada tratamento e os tempos, foi observado menor número de monócitos para todos os tratamentos com inclusão do óleo ( $p<0,05$ ) no tempo 24 horas (Figura 5). Não foi observada diferença entre as médias dos tratamentos no tempo 24 horas. Na interação do tempo 0-Estresse e tratamentos para o número de monócitos (Figura 6), foi observado menor número de células ( $p<0,05$ ) para o tratamento 0,0% em relação ao grupo 0,5%, não havendo diferença ( $p>0,05$ ) para os níveis 1,00% e 1,50% com 6,70 e 6,67%, respectivamente.

Avaliando cada tratamento em relação aos tempos de colheita para o hematócrito foi observada diferença ( $p<0,05$ ), nos grupos experimentais 0,0% e 0,5% (Figura 7) houve redução do hematócrito ( $p<0,05$ ) na comparação dos tempos, com menor valor no tempo

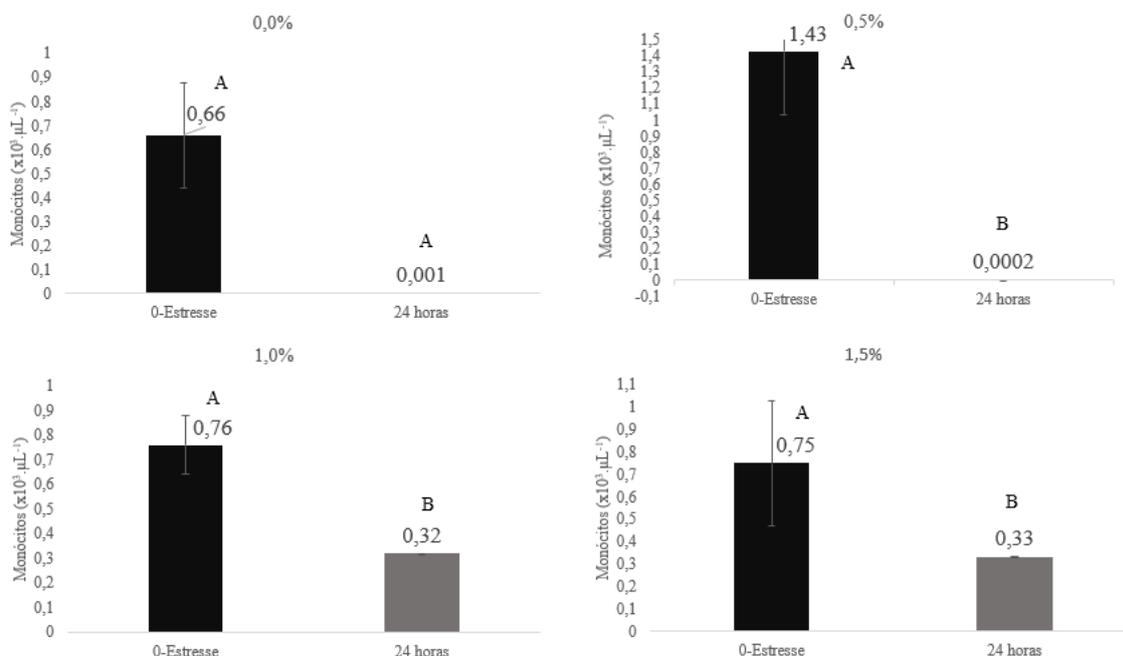
1 24 horas, para os grupos 1,0% e 1,5% não houve diferença da variável em relação aos  
 2 tempos. Houve interação entre os tempos e os tratamentos (Figura 8) na avaliação das 24  
 3 horas de exposição a *Aeromonas hydrophila*, com maior concentração da variável  
 4 observada no grupo experimental 1,0% em relação ao controle não diferindo dos demais.  
 5 Não foram observadas diferenças entre o tempo 0-Estresse e os tratamentos.

6 **Tabela 3.** Parâmetros hemato-imunológicos (média  $\pm$  desvio padrão) de cacharas alimentados  
 7 com inclusão de diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* rosc.),  
 8 após estresse induzido (0-Estresse) e desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*.

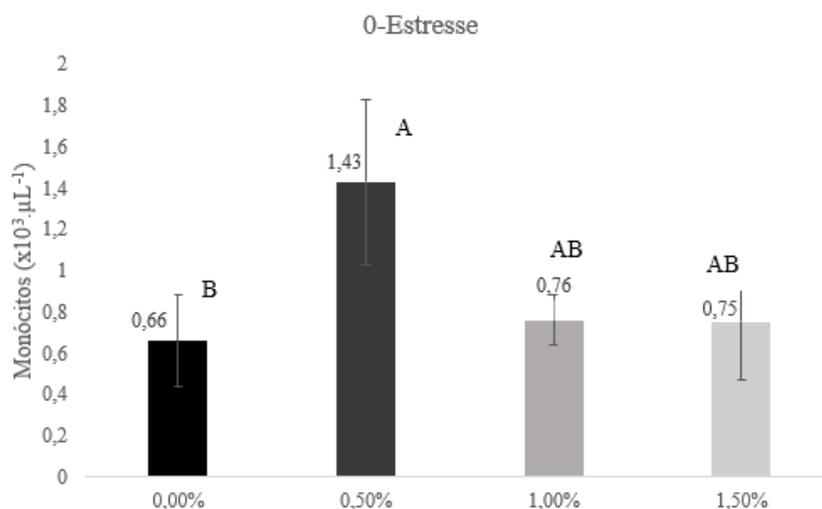
Variáveis	Conc.	Tempos de colheita sanguínea	
		0-Estresse	24 horas
Eritrócitos ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	0,0%	3,43 $\pm$ 0,87Aa	0,52 $\pm$ 0,15Aa
	0,5%	3,82 $\pm$ 1,24Aa	1,94 $\pm$ 0,69Aa
	1,0%	3,48 $\pm$ 0,67Aa	1,54 $\pm$ 1,07Aa
	1,5%	4,07 $\pm$ 1,19Aa	2,64 $\pm$ 0,84Aa
Hemoglobina (g.dL <sup>-1</sup> )	0,0%	13,94 $\pm$ 5,48Aa	9,32 $\pm$ 6,54Aa
	0,5%	16,43 $\pm$ 5,64Aa	16,13 $\pm$ 5,04Aa
	1,0%	11,77 $\pm$ 2,93Aa	9,55 $\pm$ 3,20Aa
	1,5%	9,81 $\pm$ 2,39Aa	9,85 $\pm$ 5,09Aa
Glicose (mg/dL)	0,0%	84,00 $\pm$ 10,83Aa	9,00 $\pm$ 0,00Ba
	0,5%	74,67 $\pm$ 24,80Aa	15,00 $\pm$ 0,00Ba
	1,0%	78,60 $\pm$ 28,03Aa	10,00 $\pm$ 0,00Ba
	1,5%	99,80 $\pm$ 11,70Aa	11,00 $\pm$ 1,40Ba
VCM (fL)	0,0%	170,16 $\pm$ 44,10Aa	194,03 $\pm$ 0,00Aa
	0,5%	178,58 $\pm$ 48,15Aa	201,98 $\pm$ 118,0Aa
	1,0%	150,49 $\pm$ 36,36Aa	278,65 $\pm$ 159,44Aa
	1,5%	137,45 $\pm$ 53,64Aa	146,26 $\pm$ 37,07Aa
CHCM (g.dL <sup>-1</sup> )	0,0%	30,64 $\pm$ 12,69Aa	15,28 $\pm$ 0,00Aa
	0,5%	26,32 $\pm$ 8,52Aa	27,74 $\pm$ 0,00Aa
	1,0%	22,9 $\pm$ 4,52Aa	23,35 $\pm$ 10,92Aa
	1,5%	19,9 $\pm$ 4,83Aa	26,87 $\pm$ 12,46Aa
Leucócitos totais ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	0,0%	13,84 $\pm$ 3,25 Aa	0,05 $\pm$ 0,02 Ba
	0,5%	14,93 $\pm$ 4,39 Aa	0,50 $\pm$ 0,01 Ba
	1,0%	11,72 $\pm$ 1,80 Aa	0,32 $\pm$ 0,19 Ba
	1,5%	11,20 $\pm$ 3,03 Aa	0,56 $\pm$ 0,04 Ba
Trombócitos totais ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	0,0%	10,08 $\pm$ 3,18 Aa	0,87 $\pm$ 0,63 Bb
	0,5%	8,94 $\pm$ 2,36 Aa	3,44 $\pm$ 2,44 Bb
	1,0%	6,32 $\pm$ 9,18 Aa	2,23 $\pm$ 1,59 Bab
	1,5%	10,55 $\pm$ 5,53 Aa	5,70 $\pm$ 0,79 Aa
ARL	0,0%	0,14 $\pm$ 0,05 Aa	0,15 $\pm$ 0,03 Aa
	0,5%	0,16 $\pm$ 0,06 Aa	0,25 $\pm$ 0,00 Aa
	1,0%	0,16 $\pm$ 0,04 Aa	0,22 $\pm$ 0,06 Aa
	1,5%	0,17 $\pm$ 0,05 Aa	0,18 $\pm$ 0,01 Aa
Linfócitos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	0,0%	10,29 $\pm$ 0,77 Aa	0,04 $\pm$ 0,00 Aa
	0,5%	9,81 $\pm$ 1,23 Aa	0,48 $\pm$ 0,00 Aa
	1,0%	8,19 $\pm$ 0,99 Aa	0,27 $\pm$ 0,02 Aa
	1,5%	8,07 $\pm$ 0,72 Aa	0,50 $\pm$ 0,01 Aa
Neutrófilos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	0,0%	1,04 $\pm$ 0,58 Aa	0,002 $\pm$ 0,00 Aa
	0,5%	1,96 $\pm$ 0,85 Aa	0,001 $\pm$ 0,00 Aa
	1,0%	1,32 $\pm$ 0,99 Aa	0,014 $\pm$ 0,01 Aa

	1,5%	1,01 ± 0,45 Aa	0,005 ± 0,00 Aa
	0,0%	1,25 ± 0,41 Aa	0,001 ± 0,00 Ba
Basófilos	0,5%	0,54 ± 0,16 Ab	0,004 ± 0,01 Aa
(x10 <sup>3</sup> .µL <sup>-1</sup> )	1,0%	0,76 ± 0,48 Aa	0,010 ± 0,01 Aa
	1,5%	0,44 ± 0,23 Ab	0,005 ± 0,005 Aa

- 1 Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente  
 2 significativas (P < 0,05); médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças  
 3 estatisticamente significativas (P < 0,05).

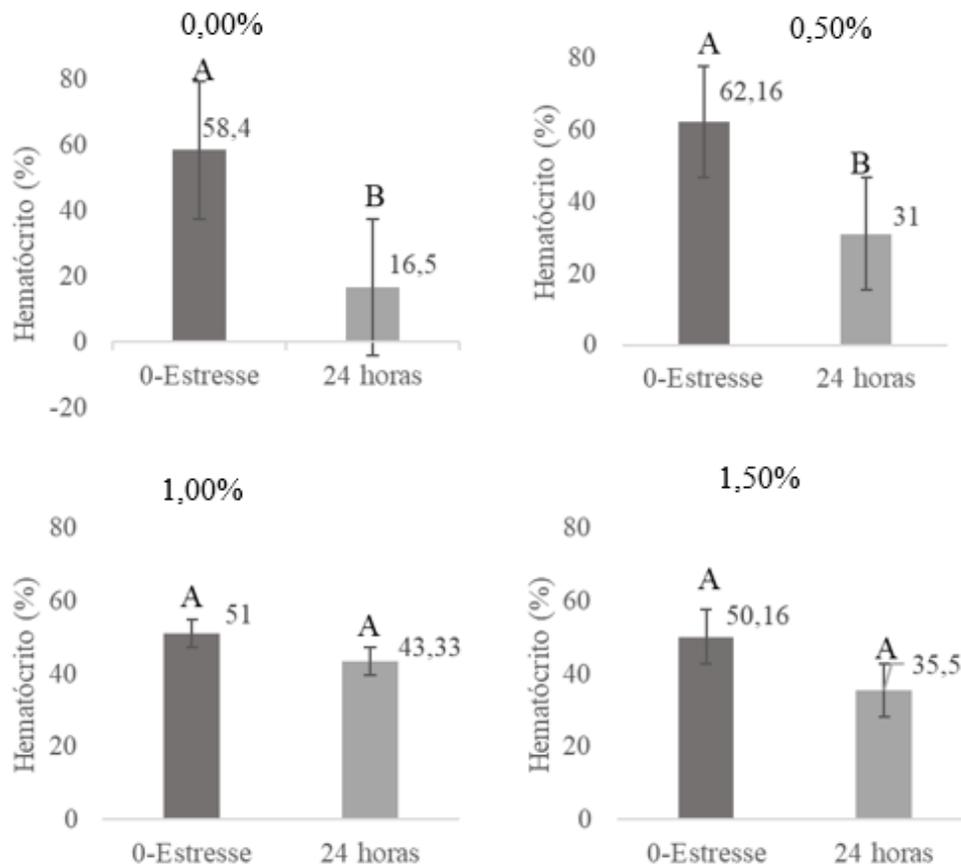


- 4 Figura 6. Contagem de monócitos (x10<sup>3</sup> µL<sup>-1</sup>) em cacharas alimentados por 65 dias com  
 5 óleo essencial de gengibre em diferentes concentrações, estressados e inoculados com  
 6 *Aeromonas hydrophila* (0,34 x10<sup>6</sup> UFC). 30 minutos após o estresse (0-Estresse;  
 7 n=6/Tratamento) e após 24 horas da infecção bacteriana (24 h; n=3/Tratamento).

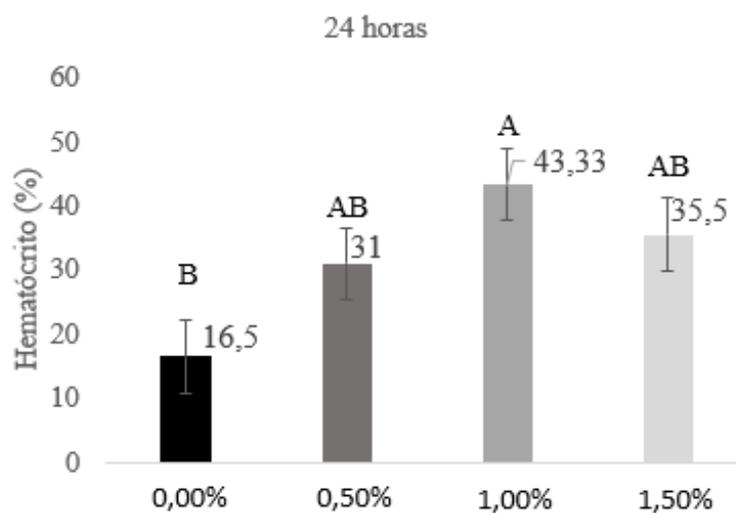


- 8 Figura 7. Contagem de monócitos (x10<sup>3</sup> µL<sup>-1</sup>) em juvenis de cacharas alimentados por 65  
 9 dias com dietas contendo diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre. Após  
 10 30 minutos do estresse induzido (0-Estresse), n= 9 peixes por tratamento.

1



2 Figura 8. Hematócrito (%) em cacharas alimentados por 65 dias com óleo essencial de  
 3 gengibre em diferentes concentrações, estressados e inoculados com *Aeromonas*  
 4 *hydrophila* ( $0,34 \times 10^6$  UFC). 30 minutos após o estresse (0-Estresse; n=6/Tratamento) e  
 5 após 24 horas da infecção bacteriana (24 h; n=3/Tratamento).



6 Figura 9. Hematócrito (%) em juvenis de cacharas alimentados por 65 dias com dietas  
 7 contendo diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre. Após 24 horas de  
 8 infecção por *Aeromonas hydrophila* ( $0,34 \times 10^6$  UFC), n= 3 peixes por tratamento.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

## 4. Discussão

### 4.1. Primeiro ensaio experimental

Ao final do período de alimentação, a inclusão de gengibre não ocasionou alteração seja ela negativa ou positiva das variáveis hematológicas dos peixes. Mesmo não levando ao incremento dessas variáveis a inclusão do óleo nos níveis estabelecidos não apresentou efeito tóxico (Brum et al., 2017), com a possibilidade de estudos futuros com maiores níveis de inclusão.

Para surubins a contagem de eritrócito está entre  $1,350$  a  $2,820 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$  (Tavares-Dias, 2009) valores inferiores ao encontrado neste trabalho. O resultado do presente estudo é similar ao relatado por Ribeiro et al (2016), onde após desafio de tabaquis alimentados com dietas contendo óleo essencial de hortelã-pimenta *Mentha piperita*, por *Aeromonas hydrophila* não evidenciaram diferença na contagem de eritrócitos entres os tratamentos de inclusão do óleo essencial avaliados. Para a hemoglobina, Segundo Tavares-Dias (2009) esta varia de  $4,2$  a  $7,2 \text{ g.dL}^{-1}$  para surubins híbridos valores abaixo do encontrado no trabalho, que pode ter sido devido a fase juvenil em que os animais estavam ou questões de manejo.

Os valores do hematócrito neste trabalho também foram mais elevados que o estabelecido por Tavares-Dias (2009) com valor mínimo e máximo de  $25$  a  $41\%$  respectivamente, semelhante ao observado na hemoglobina. Esse resultado difere do encontrado por Brum et al, (2017) que observou aumento da concentração do hematócrito para tilápia com inclusão do óleo essencial de gengibre na ração. O VCM e CHCM também não mostraram variação, que pode ter ocorrido pela falta de diferença estatística na contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina e hematócrito.

Ao final dos 65 dias de alimentação, a inclusão do óleo essencial de gengibre levou a alterações da glicose e dos parâmetros imunológicos dos cacharas. Nas pesquisas em piscicultura o níveis de glicose são utilizados como indicadores de estresse já que nos peixes a mesma é a principal fonte de energia gasta em lidar com condições desfavoráveis na tentativa de retomar a homeostasia do organismo (Labarrère et al., 2013; Brandão et al., 2005). No estudo os níveis de glicose se mantiveram em níveis aceitáveis para a

1 espécie (Silva et al., 2020; Oliveira et al., 2019), no entanto, a diferença encontrada pode  
2 ser um indício que os animais do tratamento 0,50% estavam menos susceptíveis a  
3 estresse, uma vez que, os animais foram manejados para a colheita sanguínea, onde esse  
4 tipo de procedimento pode levar a elevação da glicose sanguínea (Oliveira et al., 2019).

5 Também foram evidenciadas diferenças no tratamento 0,50% que apresentou  
6 menor número de leucócitos e maior valor de trombócitos quando comparado aos demais  
7 tratamentos. É possível dizer que o óleo essencial a 0,50% pode ter estimulado a produção  
8 de trombócitos em detrimento do número de leucócitos, tal redução causada pelo gasto  
9 de energia direcionado à produção de trombócitos (Brum et al., 2017). Esse resultado foi  
10 contrário ao trabalho de Nya & Austin (2009) que observaram que a suplementação  
11 dietária com gengibre não alterou os valores de trombócitos no sangue de trutas arco-íris  
12 (*O. mykiss*).

13 Os trombócitos, juntamente com os leucócitos compõem parte da população  
14 celular do sistema imune inato dos peixes, sendo associado com a atividade fagocítica e  
15 de coagulação sanguínea (Tavares-Dias, 2009). A associação com fagocitose ocorre pelos  
16 trombócitos apresentarem reação positiva para glicogênio intracelular, pelo método PAS,  
17 em várias espécies de peixes (Burrows et al., 2001; Ueda et al., 2001; Tavares-Dias, 2006;  
18 Tavares-Dias, 2009), que é uma característica inerente às células fagocíticas (Ueda et al.,  
19 2001).

20

#### 21 4.2. Segundo ensaio experimental

22

23 Na comparação dos tempos de colheita sanguínea foi possível observar que após  
24 24 horas do desafio houve redução significativa da glicose no sangue dos peixes para  
25 todos os tratamentos, isso pode ser um indicativo que os animais consumiram grande  
26 parte da glicose em resposta as alterações causadas pelo estresse e a infecção bacteriana,  
27 pois a glicose é a fonte de energia mais utilizada em situações de estresse, auxiliando o  
28 peixe a retornar a sua condição normal (Brandão et al., 2005; Labarrère et al., 2013).

29 Na comparação dos tempos de colheita sanguínea foi possível observar que após  
30 24 horas do desafio houve redução dos leucócitos totais presentes no sangue dos peixes,  
31 para todos os tratamentos isso pode indicar, que a maior parte dos leucócitos foram

1 mobilizados para as áreas de infecção (Brum et al., 2017). Para os trombócitos foi  
2 observado comportamento similar de possível mobilização para as áreas infectadas.

3 Foi observado que nos tratamentos com maiores inclusões do óleo essencial (1,0%  
4 e 1,5%) após 24 horas de exposição os peixes mantiveram os valores de hematócrito sem  
5 diferir do tempo anterior a infecção, se mantendo na faixa de intervalo para surubins 25  
6 a 41% (Tavares-Dias et al., 2009). No entanto, mesmo o tratamento 0,5% apresentando  
7 diferença ( $p < 0,05$ ) e redução do hematócrito após 24 horas, o nível da variável ainda se  
8 manteve na faixa normal da espécie. Essa manutenção dos níveis de hematócrito, pode  
9 ser indício do efeito do óleo essencial de gengibre, que pode ter influenciado de forma  
10 positiva a resposta e resistência dos cacharas ao estresse e desafio bacteriano (Shakya et  
11 al., 2015).

12 O hematócrito pode ser classificado como a porcentagem volumétrica de hemácias  
13 no sangue, associado então, com o transporte de oxigênio no sangue, pode também ser  
14 influenciado por fatores intrínsecos e externos como resposta ao estresse (Burgos-Aceves  
15 et al., 2019). Durante o estresse pode ocorrer uma hemoconcentração ocasionada pelo  
16 aumento da demanda de oxigênio, com o propósito de auxiliar o peixe a retornar a sua  
17 homeostase (Morales et al., 2005), entretanto, o hematócrito pode diminuir de acordo com  
18 a intensidade do estresse e tipo de desafio empregado nos peixes (Sopinka et al., 2017),  
19 como observado após 24 horas de exposição a *Aeromonas hydrophila* nos tratamentos  
20 0,0% e 0,5%.

21 Os monócitos são os maiores leucócitos presentes na circulação dos peixes e os  
22 principais responsáveis pela fagocitose (Ranzani-Paiva et al., 2013). Além disso, possuem  
23 a capacidade de migração dos vasos sanguíneos, até o local da infecção pela quimiotaxia  
24 passando a serem denominados de macrófagos (Ranzani-Paiva et al., 2013). Avaliando  
25 as interações para os monócitos, foi observado um possível efeito imunocapacitante nos  
26 peixes alimentados com o óleo essencial de gengibre, principalmente no tratamento 0,5%,  
27 pelo provável incremento da migração desse tipo de célula para área da infecção, uma  
28 vez que, houve redução drástica de monócitos na corrente sanguínea entre os tempos de  
29 amostragens (Shakya et al., 2015).

30

31

## 5. Conclusão

A inclusão dietética do óleo essencial de gengibre nas concentrações de 0,5% a 1,5% durante 65 dias não influenciou nas variáveis hematológicas dos juvenis de cachara, entretanto, a inclusão de 0,5% influenciou positivamente na produção de trombócitos. Após o estresse induzido e desafio por *Aeromonas hydrophila* os peixes alimentados com 1,0% do óleo essencial apresentaram resposta mais eficiente a ação do patógeno.

## 6. Referências bibliográficas

- ALSAID, M., ABUSELIANA, A.F., DAUD, H.H., MUSTAPHA, N.M., BEJO, S.K., ABDELHADI, Y.M., HAMDAN, R.H. Haematological, biochemical and clinical signs changes following experimental infection of *Streptococcus agalactiae* in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). Basic Res. J. Agricult. Sci. Rev. v. 4, n. (9), p. 289-285, 2015.
- ALI, B.H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M.O.; NEMMA, A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*): A review of recent research, Food Chem. Toxicol. v. 46, n.2, p. 409-420, 2008.
- BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). Ciência Rural, v. 31, n. (4), p. 687-694, 2001.
- BRICKNELL, I., DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish Shellfish Immunol. v. 19, p. 457-472, 2005.
- BRUM A, PEREIRA, S.A., OWATARI, M.S., CHAGAS, E.C., CHAVES, F.C.M., MOURINO, J.L.P. 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.
- BURGOS-ACERVES, M.A.; LIONETTI, L.; FAGGIO, C. Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced response in fish. Science of The Total Environment. v. 670, p. 1170-1183, 2019.

- 1 BURROWS, A.S.; FLETCHER, T.C.; MANNING, M. J. Haematology of the turbot,  
2 *Psetta maxima* (L.): ultrastructural, cytochemical and morphological properties of  
3 peripheral blood leucocytes. J. Appl. Ichthyol. v.17, p. 77-84, 2001.
- 4 COELHO, S.R.C. Produção intensiva de surubins híbridos em gaiolas: estudo de caso.  
5 2005. 84 fl. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz  
6 de Queiroz, Piracicaba, 2005.
- 7 COIMBRA, J.L.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S.; SOUZA, C.S.; RIBEIRO, F.L.B.  
8 Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. Pesquisa Agropecuária  
9 Brasileira, v. 41, n. 7, p. 1209-1211, 2006.
- 10 COLLIER, H.B. The standardizations of blood hemoglobin determinations. Canadian  
11 Medical Association Journal, v.50, p.550-552, 1944.
- 12 COSTA, C.M.S.; da CRUZ, M.G.; LIMA, T.B.C.; FERREIRA, L.C.; VENTURA, A.S.;  
13 BRANDÃO, F.R.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; MARTINS, JERÔNIMO,  
14 G.T. Efficacy of the essential oils of *Mentha piperita*, *Lippia alba* and *Zingiber*  
15 *officinale* to control the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in  
16 *Collossoma macropomum*. Aquaculture Reports. v. 18, 2020.
- 17 DAIRIKI, J.K., MAJOLO, C.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; OLIVEIRA, M.R.;  
18 MORAES, I.S. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para  
19 peixes. Circular Técnica, 42, Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, 8  
20 p. 2013.
- 21 FANTINI, L.; & JUNIOR, G.; PEREIRA, R.; PIRES, L.; CORRÊA FILHO, R.; POVH,  
22 Jayme. Production performance of cachara and hybrid cachapinta. Boletim do  
23 Instituto de Pesca. v. 43, p. 107-112. 2017.
- 24 FERREIRA, L.C.; CRUZ, M.G.; LIMA, T.B.C.; SERRA, B.N.V.; CHAVES, F.C.M.;  
25 CHAGAS, E.C.; VENTURA, A.S.; JERÔNIMO, G.T. Antiparasitic activity of  
26 *Mentha piperita* (Lamiaceae) essential oil against *Piscinoodinium pillulare* and its  
27 physiological effects on *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Aquaculture. v.  
28 512, 2019.
- 29 GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in  
30 the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. American Journal  
31 of Clinical Pathology, v.56, n.1, p.35-39, 1971.

- 1 HAGHIGHI, M.; SHARIF ROHANI, M. The effects of powdered ginger (*Zingiber*  
2 *officinale*) on the hematological and immunological parameters of rainbow trout  
3 *Oncorhynchus mykiss*. J. Med. Plant Herbal Ther. Res., v.1, p.7-12, 2013.
- 4 HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM C.; HEO, M.S. Impact of plant products on  
5 innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. Aquaculture,  
6 v.317, n.1, p.1-15, 2011.
- 7 LABARRERE, C. R.; FARIA, P.M.C de.; TEIXEIRA, E.AI.; MELO, M.M. Blood  
8 chemistry profile of Surubim hybrid fish (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *P.*  
9 *corruscans*) raised in different stocking densities. *Ciênc. agrotec.* [online], v.37, n.3,  
10 p. 251-258, 2013.
- 11 MORALES, A.E.; CARDENETE, G.; ABELLÁN, E.; GARCÍA-REJÓN, L.. Stress-  
12 related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex*  
13 Linnaeus, 1758). Aquaculture Research, v. 36, p. 33-40, 2005.
- 14 NYA, E.J.; AUSTIN, B. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe as an  
15 immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout,  
16 *Oncorhynchus mykiss*. J. Fish Dis. v. 32, p. 971–977, 2009.
- 17 RANZANI-PAIVA, M.J.T.; de PÁDUA S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I.  
18 Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem; 2013. 140 p
- 19 RIBEIRO, S.C.; CASTELO, A.S.; SILVA, B.M.P.; CUNHA, A.S.; PROIETTI JÚNIOR,  
20 A.A.; OBA-YOSHIOKA, E.T. Hematological responses of tambaqui *Colossoma*  
21 *macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from  
22 *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. Acta  
23 Amazonica, v. 46, n.1, p.99 – 106, 2016.
- 24 SCHALL, T.J.; BACON, K.; TOY, K.J.; GOEDDEL, D.V. Selective attraction of  
25 monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES.  
26 Nature, v. 347, p. 669–671, 1990.
- 27 SHAKYA, S.R. Medicinal uses of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) improves growth  
28 and enhances immunity in aquaculture. International Journal of Chemical Studies, v.  
29 3, n. 2, p. 83-87, 2015.
- 30 SILVA, L.A.; MARTINS, M.A.; SANTO, F.E.; OLIVEIRA, F.C.; CHAVES, F.C.M.;  
31 CHAGAS, E.C.; MARTINS, M.L.; CAMPOS, C.M. Essential oils of *Ocimum*

- 1 *gratissimum* and *Zingiber officinale* as anesthetics for the South American catfish  
2 *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Aquaculture*. v. 528, 2020.
- 3 SOARES, B.V.; NEVES, L.R.; OLIVEIRA, M.S.B.; CHAVES, F.C.M.; DIAS, M.K.R.;  
4 CHAGAS, E.C.; TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic activity of the essential oil of  
5 *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its  
6 physiological and histopathological effects. *Aquaculture*, v. 452, p. 107–114, 2016.
- 7 SOPINKA, N. M.; DONALDSON, M. R.; O’CONNOR, C. M.; SUSKI, C. D.; COOKE,  
8 S. J. Stress indicators in fish. In *Fish Physiology* (Vol. 35, p. 405–462). Academic  
9 Press, 2017.
- 10 TALPUR AD. *Mentha piperita* (peppermint) as feed additive enhanced growth  
11 performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass,  
12 *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*. v. 420, p. 71–  
13 78, 2014.
- 14 TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L.; SANTANA, A.E.  
15 Haematological Changes in *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (Osteichthyes:  
16 Cichlidae) with Gill *Ichthyophthiriasis* and *Saprolegniosis*. *BoI. Inst. Pesca*, v. 28,  
17 n.1, p. 1-9, 2003.
- 18 TAVARES-DIAS M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes,  
19 thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*. v.  
20 68, p. 1822-1833, 2006.
- 21 TAVARES-DIAS, M. *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Embrapa Amapá, 723p.,  
22 2009.
- 23 TAVECHIO, W.L.V.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o  
24 controle de patógenos em piscicultura. *B. Inst. Pesca*, v.35, n.2, p.335 - 341, 2009.
- 25 UEDA I.K, EGAMI MI, SASSO WS, MATUSHIMA ER. Cytochemical aspects of  
26 peripheral blood cells of *Oreochromis* (Tilapia) *niloticus* (Linnaeus, 1758)  
27 (Cichlidae, Teleostei). Part 11. *Braz. J. VetoRes. Anim. Sei*. v. 38, n. 6, p. 273-277,  
28 2001.
- 29 VAHEDI, A.H.; HASANPOUR, M.; AKRAMI, R.; CHITSAZ, H. Effect of dietary  
30 supplementation with ginger (*Zingiber officinale*) extract on growth, biochemical and  
31 hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*). *Iranian journal of*  
32 *aquatic animal health*, v.3, n.1, p.26-46, 2017.

- 1 VALLADÃO, G.M.R. Óleos essenciais de plantas na dieta de tilápia-do-Nilo: efeitos  
2 sobre a saúde, morfologia intestinal e microbiota. 2018, 133f. Tese (Doutorado em  
3 Aquicultura) - universidade estadual paulista “júlio de mesquita filho” centro de  
4 aquicultura da unesp – CAUNESP, Jaboticabal, 2018.
- 5 VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, C.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. Metabolic responses  
6 associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative*  
7 *Biochemistry Physiology*, v. 116C, p. 89-95, 1997.