



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Lucas Cardoso

Efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) utilizando o *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Cyprinidae) como modelo experimental

Florianópolis

2022

Lucas Cardoso

Efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) utilizando o *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Cyprinidae) como modelo experimental

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura e Recursos Pesqueiros.

Orientador: Prof. Maurício Laterça Martins, Dr.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cardoso, Lucas

Efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) utilizando o *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Cyprinidae) como modelo experimental / Lucas Cardoso ; orientador, Maurício Laterça Martins, 2022.
112 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Suplementação dietária. 3. Fitoterápicos. 4. Microbiologia. I. Martins, Maurício Laterça . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Lucas Cardoso

Efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) utilizando o *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Cyprinidae) como modelo experimental

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 05 de dezembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Maurício Laterça Martins, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Eduardo Cargnin Ferreira, Dr.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina

Felipe do Nascimento Vieira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicius, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Aquicultura e Recursos Pesqueiros.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Maurício Laterça Martins, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por orientar o meu caminhar e o meu agir em um mundo cheio de desafios. Aos meus pais, Tânia Regina Cardoso e Archimedes Silvio Cardoso, por se fazerem rocha e escudo. Aos meus irmãos, pelo incentivo. Ao meu sobrinho, Davi, que me ajudou a ressignificar meu olhar para o mundo, para as pessoas, para o simples da vida.

Ao meu parceiro, Alexandre Sardá Vieira, pela companhia nos finais de semana de alimentação dos peixes, e por tudo o que aqui é difícil colocar em palavras. Seu companheirismo também me trouxe até aqui.

Tenho profunda gratidão ao professor Dr. Maurício Laterça Martins, por inúmeras razões. Elas levariam algumas linhas desses agradecimentos, mas me atenho ao essencial: teu caráter humano me encanta; teu profissionalismo me ensina todos os dias; tua capacidade de dar liberdade e autonomia para nós, alunos, e de deixar que sejamos criativos, me fazem querer buscar sempre uma versão melhor; tua sensibilidade de permitir que a gente busque caminhos alternativos para o que, teoricamente, não tem solução, de sentar conosco e encontrar um meio de executar nossas tarefas, enfim, tua habilidade de ser professor na essência da palavra, me fazem te admirar.

Agradeço aos colegas do Laboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos, em especial à Marília Tedesco e à Silvia Terra Fontes: eu acredito, honestamente, que vocês não têm dimensão do quanto contribuíram para que eu executasse meus experimentos e chegasse ao dia da defesa dessa tese. Eu valorizo muito o profissionalismo de vocês e me derreto pela imensidão de sensibilidade e gentileza que entregam. Obrigado pelo auxílio no preparo da ração, pelos dias de alimentação dos meus peixes, pelas vezes que aferiram os parâmetros de qualidade da água e muito obrigado por tudo que me transmitiram e que ficou nas entrelinhas da rotina diária do laboratório.

Juliano Valério Luiz, conviver contigo e contar com tua presença foi e é uma dádiva. A execução do meu trabalho só foi possível porque você se fez presente, foi paciente e aliviou minhas preocupações diárias, durante os experimentos, quando dizia: “*Não se preocupa, deixa isso comigo, eu faço pra ti Lukinhas!*”. Conte sempre, reitero, sempre, comigo e com minha amizade.

Camila Lisarb Velasquez Bastolla e Miguel Angel Saldaña Serrano, quando paro pra pensar na entrega de vocês durante minhas análises no LABCAI, eu me vejo constrangido com com o tanto que me senti valorizado e amado por vocês. Às vezes, parado, reflito: “*sou sortudo de ter a chance de conviver com pessoas como Camila e Miguel. Como podem ser tão pacientes*

e amorosos? Preciso aprender mais com eles!”. Eu me espelho em vocês, pessoal e profissionalmente.

Agradeço à Luciana Aparecida Honorato, do Departamento de Farmacologia – CCB/UFSC. Muito obrigado por não me desamparar no momento em que precisei realizar as passagens tumorais nos camundongos e por todas as tuas contribuições durante minha qualificação. Tenho em mim que te agradecer pela execução dessas atividades não é suficiente, porque você me ensinou o que não vem escrito em manuais. Obrigado pela tua sensibilidade e por se colocar tão disponível.

Agradeço ao Jonathan Paulo Agnes e à Daniela Coelho dos Santos, do Departamento de Farmacologia – CCB/UFSC e Laboratório de Bioquímica Experimental – CCB/UFSC, respectivamente. Se não fossem as inúmeras explicações e orientações, o caminho seria ainda mais desafiador. Obrigado pela doação das células tumorais e pelo incentivo à execução da pesquisa, isso foi fundamental nos tempos de pandemia.

RESUMO

O aumento da incidência de doenças, entre as quais as neoplasias, intrinsecamente associadas ao processo inflamatório, tem levado ao estudo de tratamentos alternativos e/ou complementares aos convencionais. Neste sentido, este estudo avaliou o efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* (LSEO) sobre a microbiota intestinal (MI), parâmetros histológicos e de estresse oxidativo, bem como sobre a resposta inflamatória em *Danio rerio*. No primeiro experimento, para avaliação da MI, 448 animais foram distribuídos nos seguintes grupos: dieta sem suplementação - controle negativo (CN), dieta contendo álcool de cereais - álcool de cereais (AC) e animais alimentados com dietas contendo diferentes concentrações do LSEO (EO_{0,25%}, EO_{0,50%}, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}); no segundo experimento, que avaliou o efeito do fitoterápico sobre a histologia e parâmetros de estresse oxidativo, 196 peixes foram distribuídos em 28 aquários, perfazendo os seguintes tratamentos: CN, AC e animais alimentados com dieta contendo diferentes concentrações do LSEO (EO_{0,25%}, EO_{0,50%}, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}); o terceiro experimento foi realizado para avaliar o efeito de LSEO sobre o processo inflamatório induzido por Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE ou T) e sobre a histologia. Nele, os animais foram divididos em três grupos principais (CN, AC e EO) e, após um período de 15 dias de alimentação, o processo inflamatório foi induzido: parte dos animais não recebeu injeção intraperitoneal (IP) (NC), parte deles recebeu IP contendo solução salina 0,65% (SS ou S) (CN_S, AC_S e EO_S) e outra parte recebeu IP contendo CAE (CN_T, AC_T e EO_T). Como resultados, observou-se que os índices de diversidade, riqueza e abundância de bactérias na MI dos animais suplementados com EO_{0,25%} foram mais expressivos que aqueles encontrados para o CN, e o LSEO inibiu o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para glutathione reductase (GR). A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi menor em EO_{0,25%} que nos grupos EO_{1,00%} e EO_{1,25%}, e a catalase (CAT) foi mais baixa em EO_{0,25%} que no EO_{1,00%}. Em relação às alterações histológicas, os animais do grupo EO_{0,25%} do segundo experimento apresentaram menos alterações no fígado, baço e rim, bem como tiveram melhoradas as características morfológicas intestinais. No terceiro ensaio, embora os animais do grupo EO_T tenham apresentado maiores valores para monócitos e basófilos que os reportados para o grupo CN, sugerindo um possível efeito do LSEO sobre os mecanismos de defesa em *D. rerio*, em geral não foram reportadas diferenças estatísticas significativas para contagem total e diferencial de leucócitos entre os grupos suplementados e não suplementados. Nesse experimento, a análise histológica revelou menores alterações teciduais no fígado, rim, baço e intestino em EO_T do que nos demais grupos. Diante dos resultados encontrados, é possível sugerir o efeito benéfico do LSEO à concentração de 0,25% sobre a MI, parâmetros histológicos, resposta inflamatória e no alívio do estresse oxidativo de *D. rerio*.

Palavras-chave: Aquicultura. Suplementação dietária. Fitoterápicos. Microbiologia.

ABSTRACT

Neoplasms are intrinsically associated with inflammatory processes, which has led to the study of alternative and/or complementary treatments to conventional ones. This study evaluated the effect of *Lippia sidoides* essential oil (LSEO) on the intestinal microbiota (IM), histological and oxidative stress parameters, as well as with inflammatory process induced in *Danio rerio*. The first experiment evaluated the IM of 448 animals, which were divided into the following groups: diet without supplementation - negative control (NC), diet containing grain alcohol - grain alcohol (GA), and animals fed diets with different concentrations of LSEO (EO_{0.25%}, EO_{0.50%}, EO_{0.75%}, EO_{1.00%} e EO_{1.25%}). The second experiment assessed the LSEO effect on histology and oxidative stress parameters, where 196 fish were distributed into 28 aquaria, comprising the following treatments: NC, GA, and LSEO (EO_{0.25%}, EO_{0.50%}, EO_{0.75%}, EO_{1.00%} e EO_{1.25%}). The third experiment evaluated the effect of LSEO on the inflammatory process and histology associated with the injection of Ehrlich Ascitic Carcinoma (EAC). For this, 196 animals were divided into three main groups (NC, GA, EO). After 15 days of feeding, the inflammatory process was induced by: part of the animals not receiving intraperitoneal injection (IP) (NC), part of them receiving IP containing 0.65% saline solution (s) (NC_s, GA_s, and EO_s), and another part receiving IP containing EAC (NC_T, GA_T, and EO_T). Diversity, richness, and abundance indices of IM in EO_{0.25%} group were more expressive than those found for NC due to the inhibition of potentially pathogenic bacteria growth. Glutathione reductase (GR) showed no significant differences between groups. Glutathione peroxidase (GPx) activity was lower in EO_{0.25%} than EO_{1.00%} and EO_{1.25%} groups, while catalase (CAT) was lower in EO_{0.25%} than EO_{1.00%}. In the second experiment, EO_{0.25%} animals showed fewer histological changes in the liver, spleen, and kidney, which also helped to improve intestinal morphometric features. In the third trial, animals from the EO_T group showed higher values for monocytes and basophils than the NC group, suggesting a possible effect of LSEO on the defense mechanisms of *D. rerio*. In general, no statistically significant differences were reported for total and differential leukocyte count between supplemented and non-supplemented groups. In this experiment, histological analysis revealed fewer tissue alterations in the liver, kidney, spleen and intestine in EO_T than in the other groups. The overall observations indicate a potential beneficial effect of LSEO at 0.25% concentration on the IM, histological parameters, inflammatory response, and the relief of oxidative stress of *D. rerio*.

Keywords: Aquaculture. Dietary supplementation. Phytotherapeutic. Microbiology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1.1	NEOPLASIAS EM PEIXES.....	10
1.2	NEOPLASIAS EM SERES HUMANOS.....	12
1.3	ÓLEOS ESSENCIAIS E CROSSTALK ENTRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO E A OCORRÊNCIA DE TUMORES.....	13
1.4	ÓLEOS ESSENCIAIS E ESTRESSE OXIDATIVO.....	16
1.5	ÓLEOS ESSENCIAIS E HISTOLOGIA DE PEIXES.....	19
1.6	ÓLEOS ESSENCIAIS E MICROBIOLOGIA.....	21
1.7	<i>Danio rerio</i> COMO MODELO BIOLÓGICO.....	22
1.8	A ESPÉCIE ALECRIM-PIMENTA <i>Lippia sidoides</i>	23
1.9	JUSTIFICATIVA DA PESQUISA.....	24
1.10	OBJETIVOS.....	25
1.10.1	Geral.....	25
1.10.2	Específicos.....	25
	CAPÍTULO I: Efeito do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> (Verbenaceae) sobre a microbiota intestinal, enzimas antioxidantes e parâmetros histológicos de <i>Danio rerio</i> (Cyprinidae).....	26
	Resumo.....	27
	Destaques.....	27
1.	Introdução.....	28
2.	Material e métodos.....	30
2.1	<i>Extração do óleo essencial e análise da composição química.....</i>	30
2.2	<i>Preparo da dieta experimental.....</i>	31
2.3	<i>Procedência dos animais e condições experimentais.....</i>	31
2.4	<i>Delineamento experimental.....</i>	32
2.5	<i>Contagem bacteriológica do trato intestinal.....</i>	32
2.6	<i>Análise de riqueza, diversidade e abundância da microbiota intestinal.....</i>	32
2.7	<i>Análise das enzimas de estresse oxidativo.....</i>	33
2.8	<i>Análise histológica.....</i>	33
2.9	<i>Análise estatística.....</i>	34
3.	Resultados.....	34
3.1	<i>Composição dos óleos essenciais.....</i>	34
3.2	<i>Análise microbiológica do trato intestinal.....</i>	35
3.3 A	<i>álise da riqueza, diversidade e abundância da microbiota do trato intestinal por metagenômica.....</i>	36
3.4	<i>Análise das enzimas de estresse oxidativo.....</i>	44
3.5	<i>Análise histológica.....</i>	45

4.	Discussão	54
4.1	<i>Composição química do óleo essencial de Lippia sidoides.....</i>	54
4.2	<i>Efeito do óleo essencial de Lippia sidoides na microbiota intestinal de Danio rerio</i>	54
4.3	<i>Riqueza, diversidade e abundância da microbiota intestinal.....</i>	55
4.4	<i>Enzimas de estresse oxidativo.....</i>	59
4.5	<i>Parâmetros histológicos.....</i>	60
5.	Conclusão.....	61
	Declaração de conflito de interesses.....	62
	Agradecimentos.....	62
	Referências bibliográficas.....	62
	CAPÍTULO II: Óleo essencial de Lippia sidoides (Verbenaceae) melhora a resposta inflamatória e a condição histológica em Danio rerio.....	71
	Resumo.....	72
1.	Introdução.....	72
2.	Material e métodos.....	73
2.1	<i>Extração do óleo essencial e análise e composição química.....</i>	73
2.2	<i>Preparo da dieta experimental.....</i>	74
2.3	<i>Obtenção dos animais e condições experimentais.....</i>	75
2.4	<i>Delineamento experimental.....</i>	75
2.5	<i>Indução do processo inflamatório.....</i>	76
2.6	<i>Coleta e avaliação das células do exsudato.....</i>	76
2.7	<i>Análise histológica.....</i>	77
2.8	<i>Análise estatística.....</i>	77
3.	Resultados.....	77
3.1	<i>Análise da composição do óleo essencial.....</i>	77
3.2	<i>Análise do exsudato.....</i>	78
3.3	<i>Análise histológica.....</i>	80
4.	Discussão.....	88
5.	Conclusão.....	91
	Referências bibliográficas.....	91
2	CONCLUSÃO.....	96
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	98

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 NEOPLASIAS EM PEIXES

Neoplasias são definidas como um distúrbio do crescimento, caracterizado principalmente por uma incessante, anormal e excessiva proliferação de células (FLORES-LOPES et al., 2001). Diversos relatos trazidos pela literatura citam que algumas espécies de peixes, selvagens e cultivados, têm sido acometidas por esses distúrbios em decorrência de múltiplos fatores (genéticos, ambientais, de cunho viral, somente para citar alguns exemplos) nas últimas décadas (BAUMANN, 1992).

Segundo Da Rocha et al. (2018), a carcinogênese sempre começa com danos no DNA, geralmente associados a agentes químicos, físicos ou biológicos, e nos peixes está comumente associada à existência de fatores ambientais cancerígenos. Nesse sentido, o desenvolvimento da industrialização pode ter contribuído diretamente com o aumento da presença de contaminantes na água e, em última instância, estar associado à elevação do número de casos dessas neoplasias nos peixes (HARSHBARGER E CLARK, 1990).

Baumann (1998) afirma que muitas populações de peixes selvagens estão restritas a uma pequena área durante seu ciclo de vida, sendo por isso mais fácil demonstrar que os contaminantes são os principais fatores de risco. Para o autor, as principais lesões associadas com genotoxinas (principalmente hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (PAHs), cujos níveis mais elevados encontram-se nas proximidades de locais de produção de petróleo, de creosoto e de indústrias siderúrgicas), incluem tumores de pele (carcinomas e tumores escamosos), tumores de fígado (hepáticos e biliares) e lesões cutâneas pigmentadas como cromatoforomas.

A exemplo, uma série de relatos trazem informações sobre a ocorrência de tumores em carpas Koi *Cyprinus carpio*, espécie cuja produção aquícola mundial atingiu a marca de 4 129 100 t e movimentou 8 635 866 USD (x 1.000) de acordo com o Anuário Estatístico 2017 da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (FAO, 2019): branquioblastomas possivelmente espontâneos (Knüsel et al., 2007); seminoma espontâneo no fígado e parede intestinal acompanhado de sinais de letargia, anorexia, aumento abdominal e perda de escamas em um espécime macho (SIRRI et al., 2010); possível nefroblastoma acompanhado por alterações hematológicas, histológicas e observadas por ultrassonografia, bem como por meio de mudanças de comportamento alimentar (anorexia) e permanência no fundo da coluna d'água (STEGEMAN et al., 2010); aumento abdominal expressivo e motilidade

comprometida concomitante ao rápido desenvolvimento de neoplasia em oito carpas *C. carpio* adultas cultivadas no Japão (ISHIKAWA, KUWABARA e TAKAYAMA, 1976); e ocorrência de neuroepitelioma olfativo após observação de uma lesão elevada na fossa nasal esquerda de *C. carpio* (ISHIKAWA, MASAHIRO e TAKAYAMA, 1978).

Thorgaard et al. (1999) associaram a redução significativa da incidência de tumores no estômago, bexiga e rim de trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss* triploides em relação às diploides, após exposição dos animais a três carcinogênicos, ao maior envolvimento de genes supressores de tumores dos peixes triploides.

Para Spitsbergen, Buhler e Peterson (2012), além do tipo de dieta, as condições do sistema de recirculação da água são fatores altamente relacionados à ocorrência de neoplasias em *Danio rerio*. Reforçando tal entendimento, Dale et al. (2009) observaram a ocorrência de processos inflamatórios crônicos intestinais, em decorrência de ingredientes vegetais na dieta de salmão do atlântico e de truta arco-íris, como causa de tumores em peixes cultivados. O hábito alimentar também pode estar associado à suscetibilidade em maior ou menor grau de incidência de tumores: a maior parte das espécies acometidas se alimentam de organismos e partículas contaminados presentes no sedimento (onívoros bentônicos) (BAUMANN, 1998).

Bowser, Wooster e Earnest-Koons (1997), estudando os efeitos da idade do peixe *Stizostedion vitreum* e da rota de desafio na transmissão do Sarcoma Dérmico Walleye, observaram alta incidência em peixes de todas as idades quando eles foram desafiados via injeção intramuscular. Para os autores, esses sarcomas podem ser considerados invasivos porque são capazes de se expandir para partes adjacentes do corpo, para além de sua localização original.

Thatcher e Varella (1980) relacionaram a ocorrência de um tumor maligno nas brânquias do peixe amazônico *Chaetobranchius semifasciatus* com a presença de metacercárias do Trematoda *Ascocotyle* sp. encistadas dentro dos filamentos branquiais. Sugeriram que a invasão do parasito pode ter sido o gatilho que, associado a uma anomalia genética, levou ao surgimento do carcinoma nesse peixe.

Análises realizadas por Flores-Lopes et al. (2001), depois da coleta de 4928 peixes cascudos *Rineloricaria strigilata* no Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil, dão conta da observação de neoplasias em placas ósseas em 428 indivíduos, uma frequência maior do que a esperada.

1.2 NEOPLASIAS EM SERES HUMANOS

Informações contidas no *site* do Instituto Nacional do Câncer (INCA) demonstram que câncer é um termo que designa o conjunto de mais de 100 doenças associadas ao crescimento celular desordenado, que pode atingir tecidos e órgãos.

Para cada ano do biênio 2018/2019 foi prevista a incidência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer no Brasil, inclusive os de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (165.580 casos novos) apresenta a maior incidência na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (68.220), mama feminina (59.700), cólon e reto (36.360), pulmão (31.270), estômago (21.290) e colo do útero (16.370). Discriminando por sexo, o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens e o câncer de mama nas mulheres (INCA, 2019).

Em relação ao número de óbitos em decorrência do acometimento por câncer na população brasileira, referente ao ano de 2017, foram registrados 115.057 para homens e 103.583 para mulheres, totalizando 218.640 mortes (INCA, 2019)

Existem vários fármacos já consagrados na terapia do câncer. Porém, quando aplicadas isoladamente ou em conjunto, as estratégias terapêuticas demonstraram ser pouco eficazes em promover a remissão completa do câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Além disso, os tratamentos atuais têm como principal obstáculo a indução de resistência celular aos fármacos (MDR = *multidrug resistance* ou resistência multifármaco), que se caracteriza pela capacidade de células neoplásicas desenvolverem resistência simultânea a diferentes agentes quimioterápicos, os quais podem ser estruturalmente e funcionalmente relacionados (ALBERTS, BRAY e WATSON, 2008).

Adicionalmente, a quimioterapia clássica via de regra promove a inibição não-seletiva da proliferação celular e, por isso, células não-tumorais também são alvos moleculares da atuação de quimioterápicos. Os fármacos comumente empregados nesse processo exibem estreitas janelas terapêuticas, ou seja, as doses utilizadas para produzir efeito antitumoral geralmente causam severa toxicidade (REIS, 2006). Os eventos adversos provocados pela toxicidade de tais fármacos podem ser classificados em não hematológicos (toxicidades gastrointestinais, pulmonares, cardíacas, hepáticas, neurológicas, renais, vesicais, dermatológicas, disfunções reprodutivas, alterações metabólicas, reações alérgicas e a fadiga) e hematológicos (leucopenia, anemia, trombocitopenia e neutropenia febril) (BONASSA e SANTANA, 2005).

Nas recentes décadas, o interesse público nas terapias utilizando produtos naturais tem crescido drasticamente nos países industrializados e em desenvolvimento (DE SOUZA GRINEVICIUS et al, 2016). Dados de 2014 da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que 80% da população dos países em desenvolvimento ainda dependem de medicamentos tradicionais. Nesse contexto, as plantas utilizadas na medicina popular tradicional (SILVA JÚNIOR, 1997) apresentam uma vasta fonte de componentes farmacologicamente ativos, podendo ser utilizadas como uma terapêutica alternativa e adjuvante à quimioterapia (INGALE e HIVRALE, 2010).

A busca por agentes antitumorais a partir de fontes vegetais começou em 1950 com a descoberta dos alcaloides da vinca (vimblastina e vincristina). A partir de então, o “*United State National Cancer Institute*” (NCI) deu início a um amplo programa de coleta de plantas em 1960. Isso levou à descoberta de muitos quimioterápicos com atividade citotóxica, incluindo taxanos e camptocinas (CRAGG e NEWMAN, 2005).

De Melo et al. (2011), em um estudo de revisão bibliográfica, observaram 84 espécies de plantas medicinais utilizadas como agentes antitumorais no tratamento ou prevenção de câncer e tumores no Brasil. As espécies foram pertencentes a 42 famílias (as mais representativas foram Euphorbiaceae, Fabaceae, Apocynaceae, Asteraceae e Vitaceae) e 62 gêneros.

Dentre as alternativas ao uso de produtos quimioterápicos, comumente empregados no combate a doenças associadas a diferentes fatores causais, os óleos essenciais (OE) apresentam um grande potencial, pois são naturais, com ausência ou toxicidade mínima e livres de resíduos (dependendo da origem do plantio - convencional ou orgânico - e da forma de extração do óleo essencial (GONG et al., 2014; AWAD e AWAAD, 2017).

1.3 ÓLEOS ESSENCIAIS E *CROSSTALK* ENTRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO E A OCORRÊNCIA DE TUMORES

De acordo com Yoshimura (2006), estima-se que mais de 20% de todas as malignidades são iniciadas ou acentuadas pelo processo inflamatório. A inflamação está comumente associada a diversos fatores que acontecem em um organismo, como resposta a, por exemplo, injúria tecidual, morte celular, câncer, isquemia e degeneração (ARTIS e SPITS, 2015; LUCAS, ROTHWELL e GIBSON, 2006; ROCK, LAI e KONO, 2005; FERNANDES et al., 2015; HEPPNER et al., 2015; LOANE e KUMAR, 2016; WAISMAN, LIBLAU e BECHER, 2015).

Existem numerosos mediadores sintetizados e secretados durante as respostas inflamatórias e eles podem ser classificados em duas categorias principais: mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (AZAB, NASSAR e AZAB, 2016). A base desse processo tem sido melhor esclarecida mais recentemente pela descoberta do mecanismo molecular das vias de sinalização intracelular de citocinas inflamatórias como, dentre outras, fator de necrose tumoral, interferon e interleucina (YOSHIMURA, 2006).

Nesse contexto, alguns pesquisadores afirmam que o sistema imunológico pode ser entendido como uma “faca de dois gumes”. A exemplo da ocorrência de tumores, ele pode servir tanto como supressor (vigilância imune) quanto como atuar como iniciador e/ou promotor da neoplasia; observações clínicas confirmam a ideia de forte associação entre inflamação crônica e a ocorrência de câncer (BALKWILL, CHARLES e MANTOVANI, 2005; COUSSENS e WERB, 2002).

De acordo com Ronis et al. (2008), a inflamação é uma reação imunológica inicial do hospedeiro. Ela é resultado da migração celular, em especial de neutrófilos e macrófagos (GORDON, BURD e GALLI, 1990) para o sítio atingido.

Os leucócitos fazem parte do sistema imunológico e sua elevação pode contribuir para a resolução de respostas inflamatórias (VALLEJOS-VIDAL et al., 2016); macrófagos, células derivadas de um tipo de leucócito circulante (monócitos), desempenham importante papel na defesa do hospedeiro contra substâncias nocivas (PIERCE, 1990), em casos agudos e em reações inflamatórias crônicas (VERMA et al. 2010); a elevação do número de trombócitos, fragmentos citoplasmáticos anucleados, também pode contribuir para a imunidade dos peixes, na medida em que essas células multifuncionais participam do processo de coagulação e auxiliam nos mecanismos de defesa (DE PAIVA et al., 2013).

Segundo Mitoshi et al. (2014), a presença de agentes anti-inflamatórios pode explicar a eficácia de certos OE extraídos de plantas, tais como o citral e o geranial. Os OE têm sido amplamente utilizados em função de suas propriedades antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes e antibacterianas (WOOLLARD, TATHAM e BARKER, 2007). Um exemplo é o OE de timol, ao qual tem sido atribuído efeito anti-inflamatório (HUANG e LEE, 2018).

A suplementação com OE de *Zingiber officinale* (1.0 a 2.0 mL kg⁻¹ de ração) acarretou aumento na quantidade de leucócitos e trombócitos em juvenis de *Colossoma macropomum*, mas a concentração do óleo deve ser limitada a 0.5 mL kg⁻¹, para melhorar a saúde dos peixes sem causar danos ao fígado ou redução dos vilos intestinais (CHUNG et al., 2021a); Brum et al. (2017) afirmaram que a suplementação dietária com *Ocimum gratissimum* à concentração de 0,5% na dieta possibilitou a produção de maior quantidade de neutrófilos em *Oreochromis*

niloticus; Retrato semelhante foi relatado por Adel et al. (2015), que observaram aumento significativo de neutrófilos em *Rutilus frisii* alimentadas com ração contendo OE de *Mentha piperita*, levando à estimulação da resposta imunológica inata nos peixes; o OE de mentol protegeu os tecidos de *O. niloticus* contra a inflamação, bem como ativou a imunidade, a capacidade antioxidativa e a resposta anti-inflamatória (pela regulação de genes antioxidativos precursores de CAT e GPx) em animais expostos ao clorpirifós (DAWOOD et al., 2020); para Meng et al. (2022), o OE de *A. vulgaris* pode reduzir o dano oxidativo, a inflamação e o dano histológico; o efeito anti-inflamatório, reportado por Farag et al. (2021), do OE de *Petroselinum crispum* (2 mL kg⁻¹ de ração) para *O. niloticus* provavelmente é decorrente da existência de polifenóis, flavonoides e carotenoides (ABU-SERIE et al., 2019); os compostos terpênicos majoritários de OE de *Rosmarinus officinalis* L. tornaram-se mais disponíveis no local alvo, inibindo o processo inflamatório em *D. rerio* (BORGES et al., 2018); OE de *T. vulgaris* à concentração de 1% na dieta para *O. mykiss* apresentou atividades antioxidantes e imunoestimulantes, impedindo o estresse oxidativo pela modulação de citocinas inflamatórias (GHAFARIFARSANI, KACHUEI e IMANI, 2021; e o OE de *A. vulgaris* aliviou a enterite em *D. rerio*, melhorou os danos histológicos intestinais, diminuiu o estresse oxidativo no intestino e reparou a capacidade imunológica intestinal, sendo atribuído ao fitoterápico o efeito terapêutico e anti-inflamatório (MENG et al., 2022).

Alguns pesquisadores defendem fortemente que o sistema imunológico tem tanto efeitos positivos quanto negativos na tumorigênese e que o microambiente inflamatório é um componente essencial para os tumores (NAGARSHETH, WICHA e ZOU, 2017; WOO, CORRALES e GAJEWSKI, 2015; TANIGUCHI e KARIN, 2018; DISIS, 2010). Assim, o processo inflamatório pode ser um mecanismo tanto de prevenção quanto de indução à iniciação do tumor. Em condições normais, as células do sistema imunológico participam da eliminação de células cancerosas, mas situações de inflamação crônica, inclusive as induzidas por infecção bacteriana, podem levar ao crescimento tumoral (WANG et al., 2019).

Com base nessas informações, diversos autores relataram os efeitos dos OE sobre o processo inflamatório e, em última instância, sobre células tumorais. Adorjan & Buchbauer (2010) destacam que os OE têm menor custo que os medicamentos sintéticos, comumente empregados no combate ao câncer, e que a atuação do β -cariofileno, sesquiterpeno encontrado em várias espécies de plantas, tem propriedades anti-inflamatórias, antibióticas, anticarcinogênicas e anestésica local; Legault & Pichette (2007) afirmam que β -cariofileno age como potenciador de penetração, promotor ou acelerador para entrega de drogas sintéticas ao organismo, na medida em que as auxilia a ultrapassar a membrana celular; Al-Snai (2019)

observou redução do volume tumoral e da peroxidação lipídica, bem como aumento dos níveis de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH) e do tempo de vida de camundongos albinos Swiss alimentados com dieta contendo extrato metanólico de *L. nodiglora* (200 e 400 mg kg⁻¹ bw) por nove dias após a inoculação de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE). Nesse sentido, a atividade antitumoral poderia ser atribuída à elevação da atividade antioxidante nos camundongos com CAE (ASHOKKUMAR et al., 2009); o timol e outros constituintes dos OE também têm apresentado efeitos citotóxicos (JAAFARI et al., 2012; DEB et al., 2011) para células cancerígenas; *Lippia alba* e *L. sidoides* são plantas com potencial fonte de biomoléculas antitumorais (RAMOS et al., 2003; MONTEIRO et al., 2007); os principais componentes do óleo essencial de *L. sidoides* (LSEO) encontrados por Gomide et al. (2013) foram o timol (63.20%) e o o-cymene (10.89%), e *L. sidoides* e *L. salviifolia* tiveram efeito citotóxico, em função de seus constituintes majoritários, sobre células tumorais de cólon CT26.WT, ausente em linhagens celulares normais; o timol, composto fenólico conhecido por sua atividade antiproliferativa (DEB et al., 2011), apresentou atividade antioxidante e potencial redutora de carcinogênese (ÖZKAN e ERDOĞAN, 2011).

1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS E ESTRESSE OXIDATIVO

Os OE são misturas complexas de compostos voláteis, como metabólitos secundários, isolados apenas por meios físicos (extração supercrítica) de uma planta inteira, ou de parte dela, de origem taxonômica conhecida. Possuem propriedades antissépticas (bactericida, virucida e fungicida), diferentes fragrâncias e características medicinais, sendo utilizados como analgésico, sedativo, anti-inflamatório, espasmolítico e anestésico local, bem como na preservação de alimentos, como antimicrobiano (BAKKALI et al., 2008).

Os OE são uma soma de compostos voláteis e, portanto, seus efeitos podem estar associados aos diferentes componentes e suas possíveis interações. No entanto, dois ou três componentes podem responder por até 85% da mistura total e, assim, contribuir com as propriedades primárias da mistura. Por exemplo, o timol (fenol) constitui cerca de 80% do LSEO, o qual apresenta atividade antibacteriana, antiparasitária e antioxidante (BAKKALI et al., 2008). Contudo, a composição e concentração do OE nas plantas podem variar dependendo da espécie, do clima, do manejo, da idade, da fase de desenvolvimento e da parte da planta utilizada para a extração (KERROLA, GALAMBOSI e KALLIO, 1994).

Segundo Hassan et al. (2014), quando utilizados como tratamento, os OE apresentam características sinérgicas, uma vez que os compostos ativos presentes em uma planta interagem

simultaneamente, complementando ou neutralizando os possíveis efeitos negativos. Eles também podem ser usados como preventivos, inibindo o surgimento da doença. Espécies do gênero *Lippia* sp. são ricas em OE aromáticos e têm sido exploradas em várias áreas, como medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, zootecnia e aquicultura, devido ao seu potencial bioativo e facilidade de uso em larga escala (SOARES e TAVARES-DIAS, 2013, DE OLIVEIRA DE OLIVEIRA HASHIMOTO et al. 2016).

Para manter o equilíbrio fisiológico, os peixes eliminam espécies reativas de oxigênio (ROS), compostos pró-oxidantes capazes de danificar DNA, lipídios, proteínas e carboidratos (EVANS e HALLIWELL, 1999; MOREL e BAROUKI, 1999). Nesse processo, algumas enzimas, entre as quais, a SOD, a CAT, a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione-S-transferase (GST), são fundamentais para neutralizar o estresse oxidativo, bem como para prevenir e/ou reparar os danos por ele causados (SOUZA et al., 2019).

O estresse oxidativo é desencadeado quando há maior concentração de pró-oxidantes em relação a antioxidantes, levando a uma menor resposta do sistema imunológico (BILLER e TAKAHASHI, 2018). Ele ocorre, portanto, quando, por algum elemento deletério, o organismo começa a produzir ROS (ABDEL-LATIF et al., 2020; WAHEED et al., 2020). A produção excessiva de ROS leva ao desequilíbrio dos mecanismos de defesa e contribui para o desenvolvimento de processo inflamatório intestinal (CAO et al., 2020). Em geral, a superprodução de ROS é maléfica ao quadro geral de saúde do animal, mas, em casos bem específicos, ela tem sido induzida para destruir, por exemplo, células tumorais, em decorrência do aumento da permeabilização das membranas celulares (GUO et al., 2019).

Pesquisadores têm relatado os efeitos dos OE, de diversas espécies vegetais, sobre a saúde de peixes. O OE de mentol, por exemplo, ativou a resposta imune e pode ter eliminado o excesso de ROS, o que acontece por meio da secreção de respostas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (GOES et al., 2019). Meng et al. (2022) observaram que o uso do OE de *A. vulgaris*, tempo e dose dependentes, aumentou as atividades da CAT e SOD, bem como reduziu o conteúdo de ROS em *Danio rerio*. Esses resultados poderiam estar associados à proteção das biomoléculas, promovida pelo fitoterápico contra os danos oxidativos, pela remoção de radicais livres e/ou pelo estabelecimento de uma forte interação com a membrana bicamada, protegendo-a da peroxidação lipídica (AOUADI et al., 2014); Zheng et al. (2009) também relataram aumento nas atividades da CAT e SOD de *Ictalurus punctatus* alimentados com OE de *Origanum vulgare* (0,5 mL kg⁻¹ de ração); *O. niloticus* alimentadas com OE de *Cymbopogon citratus* (0,2 g kg⁻¹ de ração) e de *Pelargonium graveolens* (0.4 g kg⁻¹ de ração) apresentaram aumento na atividade da CAT e da glutathione redutase (GR) em relação àquelas alimentadas

com a dieta basal (Al-Sagheer et al., 2018); em *C. carpio* (L.) alimentadas com dietas contendo OE de *P. graveolens* (0 e 400 mg kg⁻¹), Rahman et al. (2020) verificaram elevação da concentração de enzimas antioxidantes, ou seja, da capacidade antioxidante em prevenir o estresse oxidativo e eliminar ROS; em *Rhamdia quelen* alimentados com dietas suplementadas com OE de *L. alba* (0,5 a 2 mL kg⁻¹), em comparação com os animais alimentados com a dieta controle, observou-se o estímulo a SOD, CAT e GPx (SACCOL et al., 2013); Magouz et al. (2021) observaram que a adição de OE de mentol na deita para *O. niloticus*, por oito semanas, levou ao aumento da atividade da protease à taxa de 0,30% bem como à elevação dos valores para lisozima, atividade fagocítica, índice fagocítico, SOD, CAT e GPx; *O. mykiss* alimentadas OE de *Salvia officinalis*, *Mentha spicata* e *Thymus vulgaris* (0.5 a 1.0 g kg⁻¹ de ração) apresentaram melhora na atividade da SOD e da GPx, porém houve redução das atividades da CAT, GR e GST (SÖNMEZ et al., 2015).

Ao contrário da maior parte dos relatos para peixes alimentados com dieta suplementada com OE, Khafaga et al. (2020) observaram redução das atividades da CAT e da SOD em *C. carpio* alimentadas por 30 dias com dieta contendo *O. vulgare*; e Zeppenfeld et al. (2017) afirmaram que o uso do OE de *Aloysia triphylla* (2 mL kg⁻¹) provocou redução das concentrações da SOD e CAT de *R. quelen*, quando da comparação com os animais do grupo controle.

O potencial antioxidante dos OE está fortemente associado aos seus constituintes majoritários. Segundo Chun et al. (2005), a capacidade antioxidante de *O. vulgare* está relacionada à presença de polifenóis fitogênicos como o carvacrol e o timol. Esses dois fitoconstituintes têm a habilidade específica de sequestrar radicais livres, como ROS (EMBUSCADO, 2015), de quelar íons metais de transição e de desintegrar peróxidos (YANISHLIEVA et al., 1999). No caso do OE de mentol, sua capacidade antioxidante esteve relacionada ao seu alto conteúdo de polifenóis e flavonoides, antioxidantes naturais capazes de reduzir ROS excessivos (SUTILI et al., 2018).

Segundo Ezzat Abd El-Hack et al., (2016), ao publicarem uma revisão bibliográfica sobre os efeitos do OE de timol na saúde animal, afirmaram que o timol tem atuação antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, antiviral e anti-inflamatória. Para os autores, o potencial antioxidante dessa molécula está associado à proteção contra danos celulares, ao reduzir/prevenir a perda do potencial de membrana mitocondrial e inibir a superprodução de ROS.

1.5 ÓLEOS ESSENCIAIS E HISTOLOGIA DE PEIXES

De acordo com Brasil et al. (2019), a via preferível para administrar produtos terapêuticos para peixes é a dietária, gerando benefícios à saúde em espécies de todas as faixas de tamanho e estágios de vida. A suplementação com OE tem propriedades aromáticas, que podem estimular o apetite dos animais, com consequentes efeitos positivos (CHUNG et al., 2021).

A histologia é uma ferramenta útil para a análise dos tecidos, que podem expressar possíveis efeitos tóxicos de substâncias às quais os animais estão expostos, tais como os aditivos alimentares (SCHWAIGER et al., 1997). De acordo com Yigit et al. (2017), alterações histológicas podem fornecer informações importantes sobre os efeitos de dietas não saudáveis em vários tecidos e órgãos dos peixes. Mbokane e Moyo (2020) afirmam que a histologia figura como um dos indicadores mais confiáveis de saúde dos peixes e que as alterações teciduais podem indicar se a concentração do OE adicionada à dieta é tóxica ao animal. Nesse mesmo sentido, Brum et al. (2018a) alertam que, em dietas suplementadas com OE, podem ocorrer alterações teciduais em decorrência de possível toxicidade de determinados constituintes do fitoterápico, bem como em função de doses excessivas ou condições alérgicas.

Os terpenoides, por exemplo, presentes nos OE, atuam sobre as membranas celulares das bactérias, alteram sua permeabilidade e fluidez, bem como afetam proteínas de membrana e enzimas periplasmáticas (DA CUNHA et al., 2018). A natureza lipossolúvel desses constituintes permite a inserção de seus compostos pela interação com as cadeias de lipídio da membrana, podendo promover alteração de sua estrutura, balanço eletrolítico, mudança nas propriedades e funções, entre as quais a fluidez de membrana (SIKKEMA, DE BONT e POOLMAN, 1995). Por esse princípio, os constituintes dos OE podem influenciar a comunidade microbiana, reduzindo a quantidade de bactérias maléficas ao organismo (JESUS et al., 2021).

O intestino está envolvido nas funções de digestão e absorção de nutrientes, bem como na capacidade de regulação osmótica dos peixes (DAWOOD et al., 2021). Suas características morfológicas refletem o *status* de saúde do animal e estão intrinsecamente associadas à habilidade de assimilação de nutrientes e às funções imunológicas (NICHOLSON et al., 2012). O aumento da superfície dos vilos intestinais, por exemplo, pode indicar melhora da saúde intestinal e maior capacidade de absorver nutrientes (MOHAMED et al., 2014); o incremento do número de células caliciformes sugere possível elevação da produção de muco, substância comumente associada ao sistema imunológico (por conter lisozima, imunoglobulinas, proteínas

do sistema complemento e lectinas) e que serve como barreira contra agentes patológicos (SUBRAMANIAN et al., 2007).

Juntamente com as brânquias, o fígado é um dos órgãos mais comumente examinados por meio da histologia porque sua atividade metabólica é responsável por biotransformar e eliminar substâncias perigosas ao organismo (GEWAILY et al., 2021; WOLF et al., 2015). O tecido hepático é responsável pela desintoxicação de substâncias tóxicas em todo o corpo do peixe (SUN et al., 2020; WOLF e WHEELER, 2018). Sob condições desfavoráveis, os hepatócitos são expostos ao estresse oxidativo induzido por radicais livres, podendo levar à insuficiência hepática e a outras consequências (MA et al., 2021); a picnose nos hepatócitos, por exemplo, diz respeito a uma condição degenerativa que precede à morte celular (DOS SANTOS et al., 2008).

Local primário de hematopoiese extramedular, com elementos hematopoiéticos e linfóides, o baço é um órgão envolvido na remoção de eritrócitos degenerados e envelhecidos, bem como na eliminação de materiais particulados e bactérias circulantes. De acordo com Suttie (2006), o baço é sítio de toxicidade direta e indireta, alvo de carcinógenos e suas lesões podem ocorrer na polpa vermelha, na polpa branca ou envolver esses dois compartimentos.

Os rins são responsáveis por diversas funções vitais, como respiração, excreção, acumulação e biotransformação de xenobióticos nos peixes. Nos teleósteos, o rim recebe a maior parte do sangue pós-branquial, tendo um papel importante na excreção e homeostase (NAEEMI et al., 2013; SHAHID et al., 2020).

Nos últimos anos, pesquisadores têm relatado o efeito de OE, suplementados na dieta, sobre a saúde de peixes. Brum et al. (2018a) afirmaram que o uso do OE de *O. gratissimum* L. e *Z. officinale* Rosc., em doses moderadas, apresentou efeito protetivo nos tecidos hepático, cardíaco e branquial, bem como melhorou a saúde intestinal de *O. niloticus*. No estudo dos rins, um dos órgãos mais importantes para a resposta imunológica, de *Clarias gariepinus* alimentados com dietas contendo 9 a 12 % de *Moringa oleifera* e *Artemisia afra*, a saúde dos animais foi mantida mesmo após o desafio com *Aeromonas hydrophila* (MBOKANE e MOYO, 2020). Segundo Dawood, Gewaily e Sewilam (2022), a adição de OE de mentol, substância derivada de plantas da família das hortelãs, aliviou o efeito patológico da salinidade nos vilos intestinais, melhorou a aparência estrutural do intestino, preveniu as alterações degenerativas no fígado e melhorou a estrutura hepática de *O. niloticus*.

1.6 ÓLEOS ESSENCIAIS E MICROBIOLOGIA

Entre os benefícios da utilização de produtos derivados de plantas, estão a melhoria da microbiota gastrointestinal, o desempenho de crescimento, a utilização alimentar e a melhoria do sistema imunológico dos hospedeiros (DAWOOD, 2020; GABRIEL, 2019; REVERTER et al., 2014).

Os OE têm a capacidade de melhorar a palatabilidade e a atratividade alimentares (ABDEL-LATIF et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Eles possuem habilidade de suprimir a atividade de microrganismos patogênicos no trato gastrointestinal devido sua influência na atividade das enzimas digestivas (CAO et al., 2020a; DHAMA et al., 2018), ocasionando o aumento da utilização alimentar no intestino e a melhora no consumo do alimento. Giannenas et al. (2012) afirmaram que os promotores de crescimento presentes nos OE presumidamente agem sobre a fauna microbiológica do intestino e levam a um melhor desempenho dos peixes.

De acordo com Sutili et al. (2018), em função da diversidade química e das possíveis interações entre suas moléculas, os OE são capazes de regular a composição da MI, por agir sobre a bactéria, podem modular o sistema imunológico e as respostas fisiológicas. Os autores sugerem também que os produtos derivados de plantas têm a capacidade de provocar mudanças positivas na morfologia intestinal, de promover atividades anti-inflamatórias e antioxidantes e de influenciar a quantidade e o tipo de secreções produzidas pela mucosa do intestino, levando à melhoria da digestão e absorção de nutrientes.

Em geral, os fitoterápicos podem melhorar a camada de muco que recobre o epitélio intestinal, sendo capaz de prevenir o avanço de bactérias e outros agentes maléficis ao organismo (KRAUSOVA et al., 2021). De acordo com Meng et al. (2022), uma barreira mucosa intestinal íntegra é essencial para proteger o organismo de substâncias perigosas e para prover a absorção de nutrientes. Suplementos vegetais podem aumentar a atividade de enzimas digestivas pela elevação da secreção de bile, que desempenha papel fundamental na digestão e absorção de nutrientes (PLATEL et al., 2002).

Copatti et al. (2022) afirmaram que a suplementação de LSEO na dieta de *C. macropomum* estimulou a função digestiva dos peixes, aumentando a atividade da lipase e da amilase, recomendando a concentração de 0,5 a 1 mL kg⁻¹ de dieta.

Os OE têm sido considerados mais potentes que seus constituintes separadamente, devido ao seu efeito mais seletivo e sinérgico (ÖZKAN e ERDOĞAN, 2011).

Gomide et al. (2013) acenam para o importante potencial dos monoterpenos encontrados nas espécies do gênero *Lippia*, amplamente distribuídas no Brasil, um dos maiores centros de

diversidade desse gênero, compreendendo 70-75% das espécies conhecidas (VICCINI et al., 2006).

1.7 *Danio rerio* COMO MODELO BIOLÓGICO

Grande parte da pesquisa com fármacos e aditivos alimentares depende de modelos animais para aprofundar o conhecimento de seus efeitos sistêmicos em vertebrados. Possibilitam, assim, a realização de ensaios pré-clínicos, pré-requisitos para o desenvolvimento de novos fármacos e de estratégias de tratamentos inovadores contra o câncer e outras enfermidades.

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha, é um pequeno teleósteo tropical de água doce, mede cerca de 5 cm, pode ser facilmente mantido em biotérios, pois necessita de pouco espaço, possui alta fecundidade (200 ovos por casal) e apresenta baixo custo para ser cultivado (MARTINS et al., 2017). Nos últimos anos, esta espécie vem atraindo a atenção da comunidade científica, uma vez que estudos realizados para caracterização do seu genoma indicaram que 70% de seus 26 mil genes são semelhantes aos genes humanos (HOWE et al., 2013). Além disso, vários órgãos do *D. rerio* compartilham das mesmas características fisiológicas dos órgãos humanos, podendo assim ser usados para futuras aplicações em humanos.

O *D. rerio* é um modelo ideal para o estudo da triagem de toxicidade porque um embrião desse peixe apresenta complexidade de interações fisiológicas e bioquímicas similares às interações encontradas no corpo humano. Com um alto grau de homologia ao genoma humano e aos sistemas orgânicos, os embriões desse peixe podem ser usados para monitorar as anormalidades fenotípicas e genotípicas quando da exposição a diferentes compostos. Esse teleósteo possui grande sensibilidade quando exposto a produtos químicos por ser capaz de os absorver de forma bastante rápida, quando adicionados na água ou no alimento, e acumulá-los em diferentes órgãos. Dessa forma, uma série de estudos toxicológicos e farmacológicos foram realizados utilizando o *D. rerio* como modelo experimental (MCGRATH, 2012; CABALLERO e CANDIRACCI, 2018).

Além disso, o potencial do *D. rerio* para estudos comportamentais tem sido aplicado utilizando diferentes paradigmas estímulo-resposta associados a comportamentos complexos como o dos humanos. Como objetos destes estudos, temos aqueles sobre memória, ansiedade, estresse, alteração social, atividade natatória, entre outras variáveis que tornam esta ferramenta aplicada a estudos comportamentais uma peça chave para a avaliação indireta do efeito dos

mais diversos compostos no organismo humano (KALUEFF et al., 2013; GOODWIN et al., 2016; BOSSÉ e PETERSON, 2017).

O *D. rerio* tem sido considerado um modelo ideal para o estudo da triagem de toxicidade e atividade antitumoral porque um embrião desse peixe possui a complexidade das interações apresentadas pelo corpo humano. Com um alto grau de homologia ao genoma humano e aos sistemas biológicos, os embriões dessa espécie podem ser usados para monitorar as anormalidades fenotípicas e genotípicas quando da exposição a diferentes compostos (BARBAZUK et al., 2000; MACRAE e PETERSON, 2015).

1.8 A ESPÉCIE ALECRIM-PIMENTA *Lippia sidoides*

A *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) é uma planta perene nativa da Caatinga conhecida no Brasil como alecrim-pimenta. É um tipo de arbusto que apresenta propriedades antissépticas e antimicrobianas associadas à presença de timol e carvacrol no OE obtido das folhas (CARVALHO et al., 2003; BOTELHO et al., 2007a). É amplamente utilizada na medicina popular brasileira como agente anti-infeccioso, principalmente no tratamento de infecções da boca, garganta, gastroentéricas, pele e couro cabeludo (MATOS e OLIVEIRA, 1998; COSTA et al., 2001; PASCUAL et al., 2001).

Segundo Bakkali et al. (2008), os compostos majoritários determinam a atividade do OE. As atividades biológicas desse arbusto são atribuídas à presença de um OE com alta concentração de timol e carvacrol (BOTELHO et al., 2007b). No entanto, várias compostos fenólicos identificados e isolados da *L. sidoides*, tais como o ácido 3-O-acetiloleanólico, metil 3,4-dihidroxibenzoato, lapachenol, tecomaquinona, tectoquinona, tectol, tectol acetilado, naringenina, quercetina, luteolina, glucoluteolina, taxifolina, isolariciresinol, lippsidoquinona e β -sitosterol (COSTA et al., 2001), também podem atuar sinergicamente constituindo o chamado fitocomplexo (MATOS e OLIVEIRA, 1998).

Marsik et al. (2005) mostraram que o timol, presente nas sementes de *Nigella sativa*, apresentou atividade anti-inflamatória, como demonstrado pela inibição da COX1. Estes autores consideraram a necessidade de estudos adicionais para possível uso desse composto como anti-inflamatório. O OE de *L. gracilis*, contendo timol como o principal componente (32,68%), reduziu a inflamação na pata de ratos induzida por carragenina e teve efeito antinociceptivo no modelo de contorção induzida por ácido acético (MENDES et al., 2010).

Atividades biológicas do OE e do extrato de *L. sidoides* contra vários fungos, bactérias e outros organismos patogênicos, tais como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*,

Streptococcus mutans, *Corynebacterium xerose*, *Candida albicans*, *Trichophyllum rubrum* e *T. interdigitale*, foram demonstradas por vários autores (LEMOS et al., 1990, BOTELHO et al., 2007a, SILVA et al., 2010, CAVALCANTI et al., 2010, DOS REIS et al., 2011). Cavalcanti et al. (2010) relataram atividade acaricida do LSEO e de seus principais compostos, o timol e carvacrol, contra o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). Dos Reis et al. (2011) mostraram que extratos de *L. sidoides* podem inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em peixes homogeneizados: o efeito inibitório foi observado na presença de apenas um tipo e na presença de dois tipos de bactérias. A atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* e a atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* do hidrolisado de *L. sidoides* também foram relatadas em Matos e Oliveira (1998).

Uma série de testes vêm sendo realizados utilizando *L. sidoides* para tratamento de feridas em cavalos (DE ALENCAR-ARARIPE et al., 2014), para tratamento de peritonite aguda em ratos (BOTELHO et al., 2016), para tratamento de efisema em camundongos (GAMES et al., 2016), na investigação do potencial anti-helmíntico contra nematoides gastrointestinais de ovinos (Camurça-Vasconcelos et al., 2008), e na atividade inseticida contra *Aedes aegypti* (DE LIMA et al., 2013).

Das espécies vegetais que compõem a rica flora brasileira, a *L. sidoides* destaca-se por ser uma erva aromática com comprovadas propriedades importantes na medicina popular. Porém, ainda existem poucos estudos sobre a ação e as consequências do uso de seu OE (MATOS e OLIVEIRA, 1998; DE ARAÚJO BATISTA et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015; RAJGOPAL et al., 2015).

Nesse contexto, o LSEO pode ser de interesse na pesquisa de novas moléculas anti-inflamatórias e antitumorais que apresentem importante eficácia terapêutica associada a maior seletividade para células tumorais o que reduziria os efeitos colaterais das terapias do câncer. A sua utilização para avaliar as propriedades anti-inflamatórias pode ser um importante passo nesse objetivo maior.

1.9 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

Considerando-se que: 1) a produção de organismos aquáticos tem um grande potencial: a aquicultura continental (de 32 391 078 t em 2008 para 49 508 798 t em 2017) e marinha (de 20 523 725 t em 2008 para 30 624 790 t em 2017) mundiais forneceram valores expressivos, em relação à produção de peixes, moluscos, crustáceos e outros grupos (FAO, 2019); b) o manejo empregado na aquicultura, as intensificações dos cultivos e as contaminações

ambientais são exemplos que podem estar associados ao aumento da incidência de tumores e outras doenças em peixes (ESTEBAN, MESEGUER e CUESTA, 2012); c) os custos envolvidos no cultivo de peixes geralmente são menores do que os reportados para outros grupos animais (THORGAARD et al., 1999); d) a utilização do *D. rerio* como modelo para estudar cânceres humanos pode ajudar a compreender alguns mecanismos contra tumores em peixes (ESTEBAN, MESEGUER e CUESTA, 2012); e) os OE têm sido testados para diversas aplicações em aquicultura, por conta da gama de propriedades que possuem (BRUM et al., 2017; BRUM et al., 2018b; DE OLIVEIRA HASHIMOTO et al., 2016; DE SOUZA SILVA et al., 2019; ADDAM et al., 2019), reforça-se a importância da realização do presente estudo.

1.10 OBJETIVOS

1.10.1 Geral

Avaliar os efeitos da suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia sidoides* utilizando o *Danio rerio* como modelo biológico.

1.10.2 Específicos

- Avaliar o efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre a contagem bacteriológica, riqueza, diversidade e abundância da microbiota intestinal;
- Determinar a concentração mais benéfica do óleo essencial de *Lippia sidoides* para *Danio rerio*.
- Avaliar o efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre a estrutura intestinal, fígado, rim e baço, por meio da histologia;
- Avaliar o efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre enzimas de estresse oxidativo (CAT, GR e GPx);
- Avaliar o potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *Lippia sidoides in vivo*, por meio da análise do exsudato de *Danio rerio* previamente inoculados com Carcinoma Ascítico de Ehrlich.

CAPÍTULO I

Efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* (Verbenaceae) sobre a microbiota intestinal, enzimas antioxidantes e parâmetros histológicos de *Danio rerio* (Cyprinidae)

Effect of *Lippia sidoides* (Verbenaceae) essential oil on gut microbiota, antioxidant enzymes and histological parameters of *Danio rerio* (Cyprinidae)

Lucas Cardoso^{*a}, Francisco Célio Maia Chaves^b, Tamires Henrique Ferreira^a, Domickson Silva Costa^a, William Eduardo Furtado^c, Camila Lisarb Velasquez Bastolla^d, Miguel Angel Saldaña Serrano^d, Marília Tedesco^a, Marco Shizuo Owtari^a, José Luiz Pedreira Mouriño^a e Maurício Laterça Martins^a

^aLaboratório AQUOS — Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

^bEMBRAPA Amazônia Ocidental, Rod. AM 010, km 29, Zona Rural, 69010-970 Manaus, AM, Brasil.

^cDepartment of Infectious Diseases and Public Health, Jockey Club College of Veterinary Medicine and Life Sciences, City University of Hong Kong, Hong Kong, China.

^dLaboratory of Biomarkers of Aquatic Contamination, Department of Biochemistry, CCB, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

*Author for correspondence: Lucas Cardoso. E-mail: lucaqi@gmail.com. Laboratório AQUOS- Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil. Telefone: (+55) 48 3235-2153.

Artigo redigido conforme as normas do periódico “Aquaculture” (ISSN:0044-8486).

Resumo

Esse estudo avaliou o efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* (LSEO) sobre a microbiota intestinal (MI) de *Danio rerio*. Um total de 448 peixes foram distribuídos em 28 aquários (n=16), perfazendo em quadruplicata sete tratamentos: Controle Negativo (CN): animais alimentados com dieta comercial sem suplementação; Álcool de Cereais (AC): animais alimentados com dieta comercial contendo álcool de cereais; e animais alimentados com ração comercial contendo LSEO em diferentes concentrações: EO_{0,25%}, EO_{0,50%}, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}. Após um período de 15 dias, os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta de material biológico e realização das análises. Não houve diferença significativa em relação à contagem microbiológica de *Pseudomonas* sp., bactérias ácido-láticas totais, bactérias heterotróficas totais e Vibrionaceae, entre os grupos analisados. Os índices de diversidade de bactérias presentes na MI dos animais EO_{0,25%} foram mais expressivos do que aqueles observados na dos peixes CN, e o LSEO inibiu o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas. Não houve diferenças estatísticas significativas para GR entre os grupos analisados. A atividade da GPx foi menor no grupo EO_{0,25%} do que em EO_{1,00%} e EO_{1,25%}. A CAT foi menor em EO_{0,25%} do que em EO_{1,00%}. Os animais do EO_{0,25%}, em comparação com aqueles suplementados nos demais grupos, em geral, apresentaram menores valores para perda do aspecto cordonal, perda da integridade do pâncreas e para núcleos com cariólise e cariorrexe (fígado); bem como redução da degeneração granular, da degeneração tubular e da dilatação dos capilares nos glomérulos (rim); e redução da necrose (baço). No intestino, particularmente, os resultados do presente trabalho demonstraram, em relação aos vilos, aumento do número, do comprimento, da largura, do número de células caliciformes e da área em EO_{0,25%}, quando comparado aos demais grupos (suplementados e não suplementados). Esse estudo expande nosso entendimento sobre a influência do LSEO na MI, enzimas antioxidantes e parâmetros histológicos de *D. rerio* e serve como subsídio para futuras pesquisas na prospecção de dietas que promovam a saúde dos peixes.

Palavras-chave: aquicultura; histomorfometria; suplementação dietária; fitoterápico; microbiota intestinal de peixes; sequenciamento de nova geração.

Destaques

- Óleo essencial de *Lippia sidoides* foi avaliado como suplemento na dieta de *Danio rerio* durante 15 dias;
- A suplementação dietária na concentração de EO_{0,25%} de óleo essencial de *L. sidoides* durante 15 dias possibilitou o aumento dos valores relacionados a diversidade, abundância e riqueza de espécies da microbiota intestinal de *D. rerio*;
- O óleo essencial de *L. sidoides* inibiu o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas, sendo benéfico para os peixes *D. rerio*.

1. Introdução

Os alimentos constituem uma importante fonte para a composição da microbiota intestinal (MI) dos animais. A riqueza de nutrientes faz do intestino um dos órgãos mais propícios à colonização bacteriana (Egerton et al., 2018). O perfil da comunidade dessas bactérias no trato intestinal de peixes é diverso, tem papel vital nas funções imunológicas, nutricionais, fisiológicas e patológicas (Wang et al., 2018) e pode sofrer alterações em decorrência do uso de óleos essenciais (EO) de plantas (Carda-Dieguez, Mira & Fouz, 2014).

Os OE podem ser utilizados tanto como tratamento, quanto como preventivo, ao fortalecer o sistema imunológico e inibir o surgimento de doenças (Hassan et al., 2014). Espécies do gênero *Lippia* sp. são ricas em OE aromáticos e têm sido exploradas em várias áreas, como medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, zootecnia e aquicultura, devido ao seu potencial bioativo e facilidade de uso em larga escala (Soares e Tavares-Dias, 2013; De Oliveira Hashimoto et al. 2016). Dentro do gênero, destaca-se a *Lippia sidoides*, cujo OE apresenta atividades antibacteriana, antiparasitária e antioxidante, fortemente associadas ao seu composto majoritário, o timol (Bakkali et al., 2008). Nesse contexto, uma série de testes vêm sendo realizados utilizando *L. sidoides* para tratamento de feridas em cavalos (de Alencar-Araripe et al., 2014), de peritonite aguda em ratos (Botelho et al., 2016), de efisema em camundongos (Games et al., 2016), na investigação do potencial anti-helmíntico contra nematoides gastrointestinais de ovinos (Camurça-Vasconcelos et al., 2008) e na atividade inseticida contra *Aedes aegypti* (de Lima et al., 2013).

Das espécies vegetais que compõem a rica flora brasileira, a *L. sidoides* (alecrim-pimenta) destaca-se por ser uma erva aromática com comprovada atividade antimicrobiana, utilizada na medicina popular como agente anti-inflamatório, imunomodulador, anti-infeccioso e antisséptico (Costa et al, 2002; Hassan et al., 2014). O uso do EO dessa planta incorporado na dieta para peixes é uma prática em expansão e pode resultar na proteção contra diferentes tipos de enfermidades (Tavares-Dias, 2018), possui capacidade de aumentar a sobrevivência e pode elevar as taxas respiratórias de leucócitos após desafio bacteriano (Monteiro et al., 2021). Porém, ainda existem poucos estudos sobre a ação e as consequências da sua utilização (Matos & Oliveira, 1998; De Araújo Batista et al., 2013; Guimarães et al., 2014; Guimarães et al., 2015; Rajgopal et al., 2015).

O *Danio rerio* é um pequeno teleósteo tropical de água doce, mede cerca de 5 cm, pode ser facilmente mantido em biotérios, pois necessita de pouco espaço, possui alta fecundidade (200 ovos por casal) e apresenta baixo custo para ser cultivado (Martins et al.,

2017; Rivero-Wendt et al., 2020). Nos últimos anos, esta espécie vem atraindo a atenção da comunidade científica e tem sido utilizada como modelo biológico para uma série de estudos, uma vez que pesquisas realizadas para caracterização do seu genoma indicaram que 70% de seus 26 mil genes são semelhantes aos dos humanos (Howe et al., 2013).). A espécie é considerada um modelo biológico também porque agrega características como boa tratabilidade do material genético e similaridades anatômicas (Mushtaq et al., 2013).

Em termos de enfermidades no *D. rerio*, destacam-se a doença do veludo, cujo agente etiológico é um protozoário dinoflagelado do gênero *Piscinoodinium*, a capilarirose ou capilariase, provocada por Nematoda do gênero *Pseudocapillaria*, a microsporidiose ocasionada por *Pseudoloma neurophilia* e a tuberculose ou micobacteriose, uma das mais comuns, causada por *Mycobacterium spp.* (Goven & Amend, 1982; Brand, Granato, & Nüsslein-Volhard, 2002; Novotny et al., 2004; & Kent et al., 2011).

Em geral, o intestino dos animais abriga uma diversa população de bactérias patogênicas, não patogênicas e comensais, as quais podem contribuir para o estado geral de saúde e surto de doença no indivíduo (Nayak, 2010). Se houver distúrbios entre a GM endógena e os mecanismos de controle do hospedeiro, patógenos presentes na população transitória podem causar sérios danos aos organismos (Sekirov & Finlay 2009). De acordo com Gómez & Balcázar (2008), embora o hospedeiro tenha desenvolvido mecanismos tolerogênicos, permitindo um convivência pacífica e produtiva com sua microbiota endógena, permanece altamente responsivo às bactérias enteropatogênicas.

De acordo com Evans e Cooke (2004) e Yousefi et al. (2022), é relevante que se estabeleçam mecanismos para que o sistema antioxidante funcione de maneira mais adequada, de modo a impedir e/ou reduzir a formação de radicais livres (espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS)) e, em última instância, a ocorrência de eventos deletérios à saúde dos animais. Nesse contexto, as enzimas do estresse oxidativo estão relacionadas ao processo de detoxificação de compostos formados nos seres vivos e possuem fundamental importância para manutenção da vida. A mensuração e análise da atividade dessas enzimas, tais quais superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx), possibilitam criar condições para melhor controlar o ambiente e funcionam como alerta de contaminação, por exemplo (Cogo et al., 2009).

De acordo com Hinton (1990), a histologia é uma ferramenta comumente utilizada para avaliar possíveis lesões encontradas nos tecidos provocadas por mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo. Tais alterações podem ser consequência de agentes ambientais ou

patogênicos (Guerra-Santos et al., 2012; Santos et al., 2017) e respondem a exposição aguda ou crônica a diferentes condições e/ou substâncias (Hinton et al., 1992).

Portanto, em função da relação existente entre a MI dos peixes e a nutrição, o desenvolvimento epitelial, a regulação imunológica e os surtos de doenças (Salminen, Gueimonde, & Isolauri, 2005; Nayak, 2010), o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do uso do LSEO sobre a MI, sobre algumas enzimas de estresse oxidativo e sobre a histologia de fígado, baço, rim e intestino utilizando o *D. rerio* como modelo experimental.

2. Material e métodos

2.1 Extração do óleo essencial e análise de composição química

O óleo essencial utilizado neste estudo foi obtido a partir das folhas de *L. sidoides* cultivadas na Seção de Plantas Medicinais da EMBRAPA Amazônia Ocidental, situada em Manaus, AM (03° 06'23.04" S e 60° 01'35.14" W), com altitude média de 50 m e precipitação anual média de 2200 mm. As plantas foram coletadas no período da manhã e o material processado no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Brasil. A extração de óleo foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando um equipamento tipo Clevenger. Depois disso, os óleos foram mantidos refrigerados a -18 °C em vidros escuros.

Para análise de composição química foi utilizado um cromatógrafo gasoso Agilent (Palo Alto, USA) 7890A equipado com coluna capilar HP-5 (5% -difenil-95% -dimetil silício 30 m × 0,32 mm x 0,25 µm). A temperatura foi programada em 60 a 240 °C, a 3 °C min⁻¹, e utilizou-se hidrogênio como gás de arraste (1,5 mL min⁻¹). Um total de 1,0 µL de solução de óleo essencial a 1% em diclorometano (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) com divisão de fluxo (1: 100, injetor a 250 °C) foi injetado. O espectro de massa foi obtido em um sistema Agilent 5973 N operado no modo de impacto eletrônico (EIMS) a 70 eV, acoplado em um cromatógrafo Agilent 6890 usando o mesmo procedimento de injeção e temperatura citados acima. Os índices de retenção foram calculados a partir dos tempos de retenção dos compostos de uma série de n-alcenos (C7-C26). A identificação e quantificação dos compostos majoritários foram realizadas por comparação do espectro de massa obtido com os dados da biblioteca espectral (Wiley 6th Ed.) e pelos índices de retenção calculados e comparados com os valores publicados (Adams, 2007).

O depósito da espécie foi realizado no Herbário EAFM (Herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - CMZL) sob o número 13.882: nome científico: *Lippia sidoides*; nome comum: alecrim-pimenta; família: Verbenaceae.

2.2 Preparo da dieta experimental

O preparo das dietas experimentais utilizou como base a ração comercial extrusada Nutripiscis Starter 45 da Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda. 0,8 mm e a inclusão do LSEO foi realizada de acordo com Dairiki et al. (2013). Nesse sentido, utilizou-se álcool de cereais como veículo de incorporação para diluição do óleo. Para cada 100 g de ração foi aspergido 10 mL de álcool de cereais com o LSEO diluído em diferentes concentrações; no tratamento álcool de cereais (AC), houve aspersão somente do álcool de cereais sobre a ração na mesma proporção. A secagem da ração foi feita à temperatura ambiente por 24 h e posteriormente armazenada a -18°C. No dia anterior ao fornecimento, a ração era pesada e armazenada a 4 °C até o momento da alimentação. As rações experimentais foram ofertadas pelo período de 15 dias, três vezes ao dia e com quantidade correspondente a 5% da biomassa total do aquário.

2.3 Procedência dos animais e condições experimentais

Os peixes *D. rerio* foram adquiridos de uma piscicultura comercial no Município de Araquari, Santa Catarina, e transportados até o Laboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos, da Universidade Federal de Santa Catarina, para realização dos experimentos. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC 8442200220).

Os procedimentos de manejo dos peixes e de manutenção dos parâmetros de qualidade da água levaram em consideração as recomendações da CEUA e do manual intitulado “*Zebrafish* – Manual de criação em biotério” (Dammski et al., 2011). Para tanto, foram utilizados como unidades experimentais aquários plásticos retangulares de 16 L de volume útil, dispostos no Bioensaio de Peixes Ornamentais do Laboratório AQUOS/UFSC. A água utilizada nos experimentos passou por processo de descloração com tiosulfato de sódio (5 mL de uma solução (50 g de tiosulfato de sódio diluído em 500 mL de água destilada) foram aplicados em 250 L de água do sistema).

As unidades experimentais foram acopladas a um sistema de recirculação de água do tipo semi-aberto, com filtros mecânicos, biológicos (anaeróbio e aeróbio) e esterilização ultravioleta; a taxa de renovação da água foi de aproximadamente 20 % ao dia e o excesso de fezes removido por sifonagem duas vezes ao dia; o fotoperíodo foi controlado 12L:12E (luz e

escuro); em relação aos parâmetros de qualidade de água, temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram medidos diariamente com auxílio de multiparâmetro (Hanna[®], modelo HI-9828, USA); já amônia total, nitrito e nitrato foram medidos todos os dias por teste colorimétrico (Alfakit[®], Brasil). Durante o período experimental, a temperatura média foi de $27,40 \pm 2,60$ °C, oxigênio dissolvido $7,33 \pm 1,00$ mg.L⁻¹, pH $6,62 \pm 0,21$, amônia total $0,06 \pm 0,02$ mg.L⁻¹, nitrito $0,02 \pm 0,02$ mg.L⁻¹, nitrato $0,00 \pm 0,00$ mg.L⁻¹.

2.4 Delineamento experimental

Um total de 448 peixes (peso de $0,3 \pm 0,04$ g e comprimento de $2,7 \pm 0,23$ cm) foram distribuídos em 28 aquários (n=16), perfazendo em quadruplicata os sete grupos seguintes: Controle Negativo (CN): animais alimentados com dieta comercial sem suplementação; Álcool de Cereais (AC): animais alimentados com dieta comercial contendo álcool de cereais; e animais alimentados com ração comercial contendo LSEO em diferentes concentrações: EO_{0,25%}, EO_{0,50%}, EO_{0,75%}; EO_{1,00%}; EO_{1,25%}.

Após um período de 15 dias, os animais foram anestesiados (60 µL de solução estoque de óleo de cravo (10%, diluída em etanol) por 1 mL de água) (Grush & Noakes, 2004) e eutanasiados para coleta de material biológico e realização das análises propostas.

2.5 Contagem bacteriológica do trato intestinal

A fim de verificar alterações na MI dos animais que pudessem ser associadas ao tratamento com LSEO, ao final do ensaio, após jejum dos peixes por 24 h, os intestinos de quatro animais por aquário foram coletados assepticamente, pesados, macerados, diluídos serialmente em solução salina estéril 0,65 % na proporção de 1:10 e posteriormente as diluições de 10^{-4} a 10^{-9} foram semeadas em: meio de ágar Man Rogosa Sharpe (MRS, Himedia[®] para bactérias ácido-láticas totais cultiváveis) com azul de anilina e Ágar Triptona de Soja (TSA, Himedia[®] para bactérias heterotróficas totais cultiváveis); as diluições 10^{-1} a 10^{-4} foram semeadas em: ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Himedia[®] para vibriónáceas cultiváveis) e ágar Cetrimid (Himedia[®] para *Pseudomonas* sp. cultiváveis). Todos os meios de cultura foram incubados a 30 °C por 24 h, com exceção do MRS que foi incubado a 35 °C por 48 h (Jatobá et al., 2008).

2.6 Análise de riqueza, diversidade e abundância da microbiota intestinal

Visando verificar as alterações da MI em nível de espécie foi realizada a análise “Next-generation sequencing” (NGS). Para isso, o trato intestinal de dois animais por aquário foi

retirado assepticamente, teve seu conteúdo raspado com auxílio de *swab* e armazenado em microtubo contendo Solução NeoSample-Z (Neoprosecta microbiome technologies®, Santa Catarina, Brasil) à temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram enviadas à empresa Neoprosecta Microbiome Technologies® (Santa Catarina, Brasil) para realização da análise de unidades taxonômicas operacionais (OTU) utilizando metagenômica, técnica capaz de fornecer dados de abundância relativa, riqueza e diversidade de bactérias presentes na MI, em nível de espécie.

2.7 Análise das enzimas de estresse oxidativo

Para verificação da atividade enzimática, foram realizadas análises de quantificação de enzimas de estresse oxidativo, como Catalase (CAT), Glutathione Redutase (GR) e Glutathione Peroxidase (GPx), a partir do fígado dos animais. Para isso, foi realizado um *pool* de partes do tecido hepático de quatro animais por aquário, totalizando 100 mg de tecido por amostra. O tecido foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 50 mM, KCl 0,15 M, PMSF 100 µM, pH 7,4, na proporção de 1 g de tecido para 5 mL de tampão (1:5). O homogeneizado foi centrifugado a $9000 \times g$ por 30 min a 4 °C. As análises enzimáticas foram realizadas a partir da fração sobrenadante.

A atividade da GR foi realizada de acordo com o descrito por Carlberg e Mannervik (1985), pela velocidade de consumo de NADPH. Assim, ao reduzir o substrato glutathione dissulfidica (GSSG), a GR oxida NADPH, que pode ser monitorado pelo decréscimo de absorbância no comprimento de onda de 340nm. Em relação à GPx, sua determinação foi realizada indiretamente a partir da taxa de decaimento da NADPH, utilizando espectrofotometria (340 nm), e expressa em mM/min/mg de proteína, de acordo com metodologia de Flohé e Gungler (1984). Já a quantificação da atividade da CAT foi realizada conforme método de Aebi (1984), ou seja, pela medida da velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela enzima através do decréscimo de absorbância a 240 nm ($\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a 25 °C.

2.8 Análise histológica

Fragmentos de fígado, baço, intestino e rim de 84 peixes (3 por aquário) foram coletados e fixados em solução de formalina 10 % tamponada para avaliar as alterações provocadas nos animais submetidos à suplementação dietária com LSEO. Os órgãos foram desidratados em série crescente de álcool, clarificados em xilol, embebidos em parafina aquecida a 60 °C e seccionados à espessura de 4 µm (Humason, 1962). As lâminas permanentes foram montadas em Entellan® e analisadas em microscopia de contraste de interferência

diferencial (DIC) (ZEISS, Axio Imager A.2, Gottingen, Alemanha). As alterações histológicas foram avaliadas semiquantitativamente conforme o grau de severidade das lesões: 0 (ausência de alteração), 1 (alteração leve, correspondendo a menos de 25 % da área tecidual), 2 (alteração moderada, com 25 a 50 % da área tecidual) e 3 (alteração severa, com mais de 50% da área tecidual), de acordo com método descrito por Schwaiger et al. (1997) e modificado por Brum et al. (2018). Ademais, foi realizada a histomorfometria intestinal, isto é, foram medidos comprimento, largura, área e perímetro dos vilos, bem como quantificado o número de células caliciformes por vilo, utilizando, para tanto, fotomicrografias obtidas em DIC equipado com sistema de captura de imagem e software Zen Pro (Zeiss, Alemanha).

2.9 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para verificar normalidade e homocedasticidade de variância, respectivamente. Os dados não homogêneos foram transformados em $\log_{10}(x+1)$. Estando os pressupostos garantidos, os dados foram submetidos à análise de variância anova unifatorial e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Todos os testes foram realizados ao nível significância de 5% com auxílio do *software* Statistica 10.0. O programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) foi utilizado para identificar a microbiota central, definida neste estudo como unidades taxonômicas operacionais (OTUs), as quais foram relacionadas aos seus táxons correspondentes. Os resultados da caracterização do microbioma são apresentados em níveis taxonômicos. Os gráficos do mapa de calor para filo, classe e gênero foram produzidos a partir do *Heatmapper* (Babicki et al., 2016). Para tal, as OTUs foram agrupadas (*clustering*) pelo método de ligação média (*average linkage*) e para o distanciamento usou-se *Euclidean* (Yang & Xu, 2020). Já para o diagrama de Venn, utilizou-se o InteractiVenn (Heberle et al., 2015). Além disso, o perfil de diversidade (*Diversity Profiles*) e Análise de Coordenada Principal (PCoA) foram realizadas através do emprego do programa PAST 4.03 (Hammer, Harper & Ryan, 2001). Para o PCoA, o índice de similaridade foi calculado por *Euclidean*.

3. Resultados

3.1 Composição dos óleos essenciais

O óleo essencial de alecrim-pimenta (Tabela 1) mostrou o timol como composição majoritária (72,2 %), seguido de *p-cimeno* (8,1 %) e (E)-cariofileno (4,9 %).

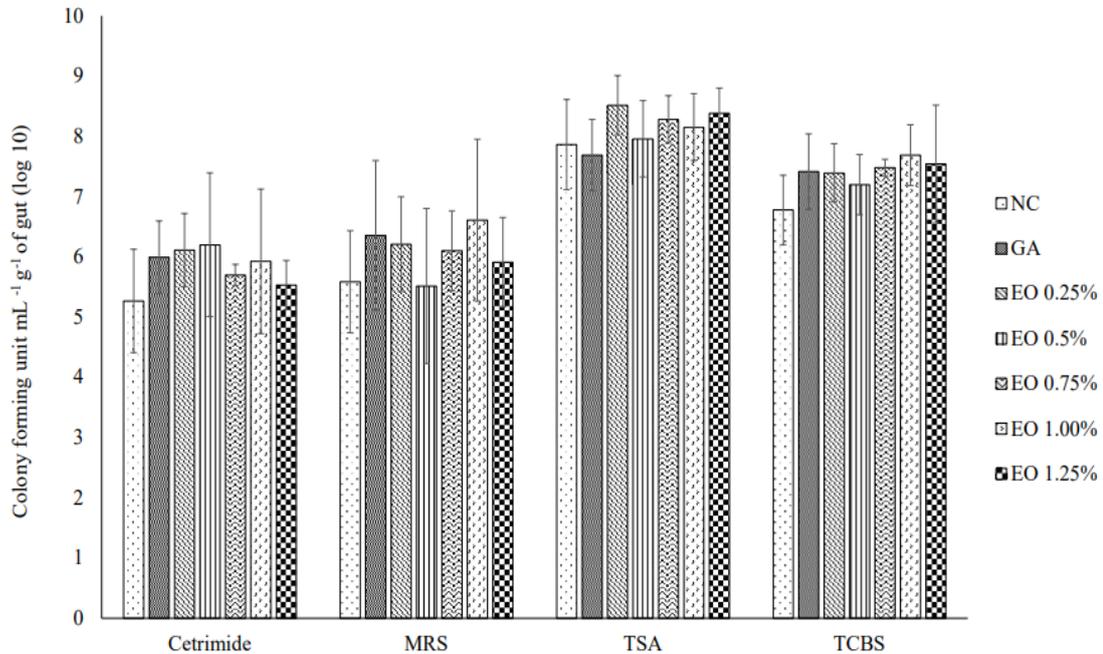
Tabela 1: composição do óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*); n.i = compostos não identificados.

Componentes	Teor (%)	Índice de retenção (IR)
Timol	72,2	1289
<i>p</i> -cimeno	8,1	1022
γ -terpineno	2,2	1054
(E)-cariofileno	4,9	1417
mirceno	1,5	988
óxido de cariofileno	1,3	1582
terpinen-4-ol	1,1	1174
timol, metil-éter	1	1232
α -terpineno	0,9	1014
carvacrol	0,9	1298
limoneno	0,6	1024
α -tujeno	0,5	924
1,8-cineol	0,5	1026
ipsidienol	0,5	1140
α -copaeno	0,5	1374
n.i.	0,5	-
aromadendreno	0,4	1429
α -pineno	0,3	932
viridifloreno	0,3	1496
δ -cadineno	0,3	1522
α -humuleno	0,2	1452
espatulenol	0,2	1577
β -pineno	0,1	974
α -felandremo	0,1	1002
δ -3-careno	0,1	1008
(Z)- β -ocimeno	0,1	1032
(E)- β -ocimeno	0,1	1044
terpinoleno	0,1	1086
linalol	0,1	1098
α -terpineol	0,1	1186
n.i.	0,1	1289
<i>allo</i> -aromadendreno	0,1	1458
α -muuroleno	0,1	1500

3.2 Análise microbiológica do trato intestinal

Na análise microbiológica do trato intestinal, não houve diferenças estatísticas significativas (Figura 1) entre os animais alimentados com dieta suplementada e aqueles alimentados com ração sem suplementação do LSEO.

Figura 1: Contagem microbiológica de *Pseudomonas* sp. (Cetrimide), bactérias ácido-láticas totais (MRS), bactérias heterotróficas totais (TSA) e *Vibrionacea* (TCBS) por grama de intestino de *Danio rerio* após 15 dias de alimentação com ração suplementada com óleo essencial de *Lippia sidoides* a EO_{0,25%}, EO_{0,50%}, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}, com ração não suplementada (controle negativo) (CN) e com ração suplementada com álcool de cereais (AC). Os dados são apresentados em média e desvio padrão.



3.3 Análise da riqueza, diversidade e abundância da microbiota intestinal por metagenômica

Em termos do número total de *Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs)* (Figura 2), o valor mais expressivo (56%) foi observado nos animais do EO_{0,25%}. Os demais grupos apresentaram números similares entre si: CN (10%), EO_{0,75%} (9%), EO_{0,50%} e EO_{1,25%} com 8% cada, EO_{1,00%} (7%) e AC (2%).

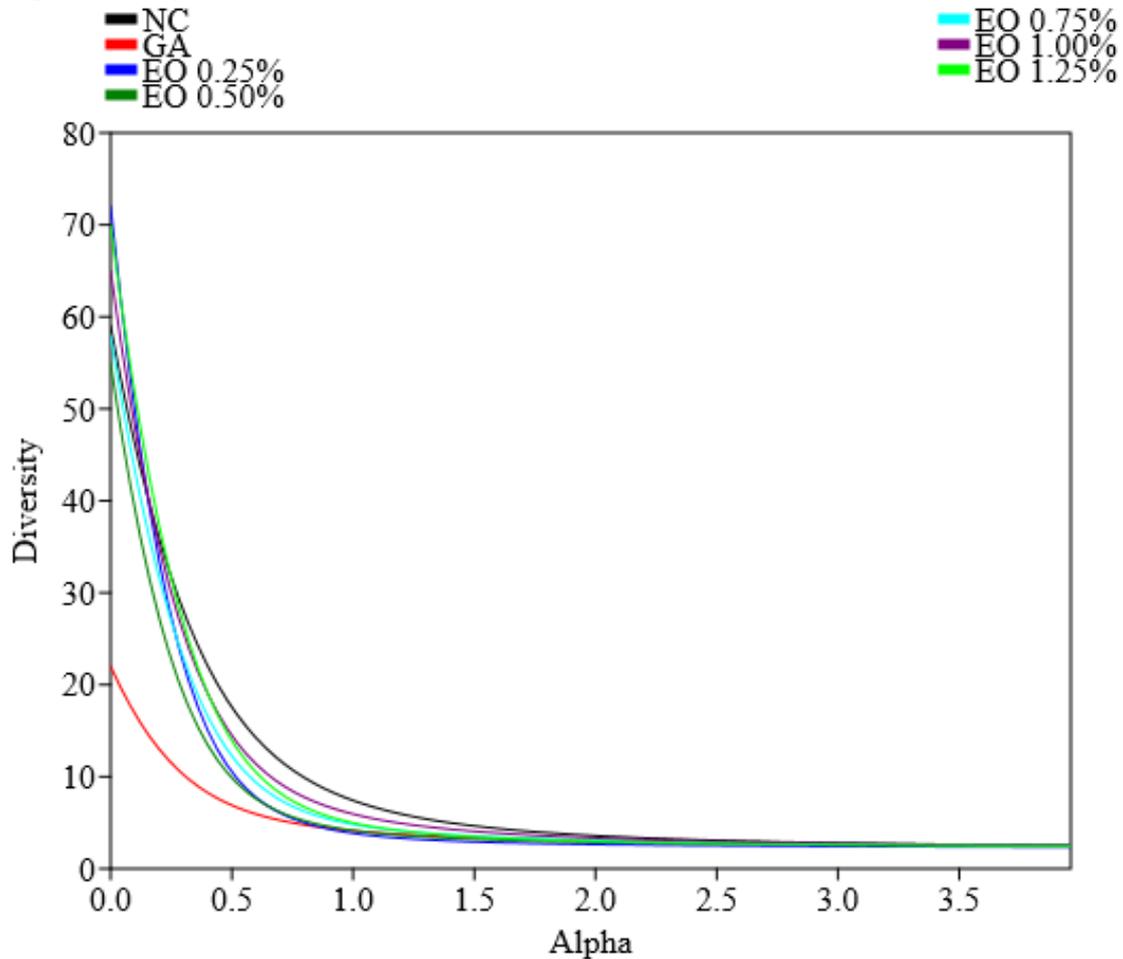
O *Índice de Diversidade* da comunidade microbiana identificada a partir do raspado intestinal dos animais do presente estudo são retratados na Tabela 2. Nesse sentido, é possível observar que os animais do tratamento EO_{0,25%}, em comparação com os peixes dos demais grupos, apresentaram maiores valores de Taxa (71), OTUs (68099), Dominância (0,51) e Índice de Berger-Parker (0,70), e menores valores para os Índices Simpson (0,49), Shannon (1314), Evennes (0,05), Menhinick (0,27), Margalef (6,29), Equitability (0,31); o Índice Brillouin foi maior no EO_{1,00%} (2162) e menor nos animais do CN (2,61); o Índice Fisher_alpha foi maior no EO_{1,00%} (9498) e menor no EO_{1,25%} (10,06); e o índice Chao-1 foi maior no EO_{0,25%} e EO_{1,25%}, com valor de 71, e menor nos demais grupos.

Tabela 2: Índices de Diversidade da comunidade microbiana do trato intestinal de *Danio rerio* após 15 dias de alimentação com ração suplementada com com óleo essencial de *Lippia sidoides* a EO_{0,25%}, EO_{0,50%}, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}, com ração não suplementada (controle negativo) (CN) e suplementada com álcool de cereais (AC).

Índice de diversidade	CN	AC	EO0.25%	EO0.50%	EO0.75%	EO1.00%	EO1.25%
Taxa	58	21	71	54	57	64	69
OTUs	12629	2215	68099	10011	10856	8008	9580
Dominance	0.11	0.32	0.51	0.38	0.29	0.20	0.34
Simpson	0.89	0.68	0.49	0.62	0.71	0.80	0.66
Shannon	2622	1451	1314	1465	1754	2179	1826
Evenness	0.24	0.20	0.05	0.08	0.10	0.14	0.09
Brillouin	2.61	1432	1311	1454	1742	2162	1811
Menhinick	0.52	0.45	0.27	0.54	0.55	0.71	0.70
Margalef	6036	2596	6.29	5754	6026	7009	7418
Equitability	0.64	0.48	0.31	0.37	0.43	0.52	0.43
Fisher_alpha	7856	3212	7827	7503	7886	9498	10.06
Berger-Parker	0.17	0.46	0.70	0.52	0.42	0.36	0.55
Chao-1	59	22	71	55	58	67.5	71

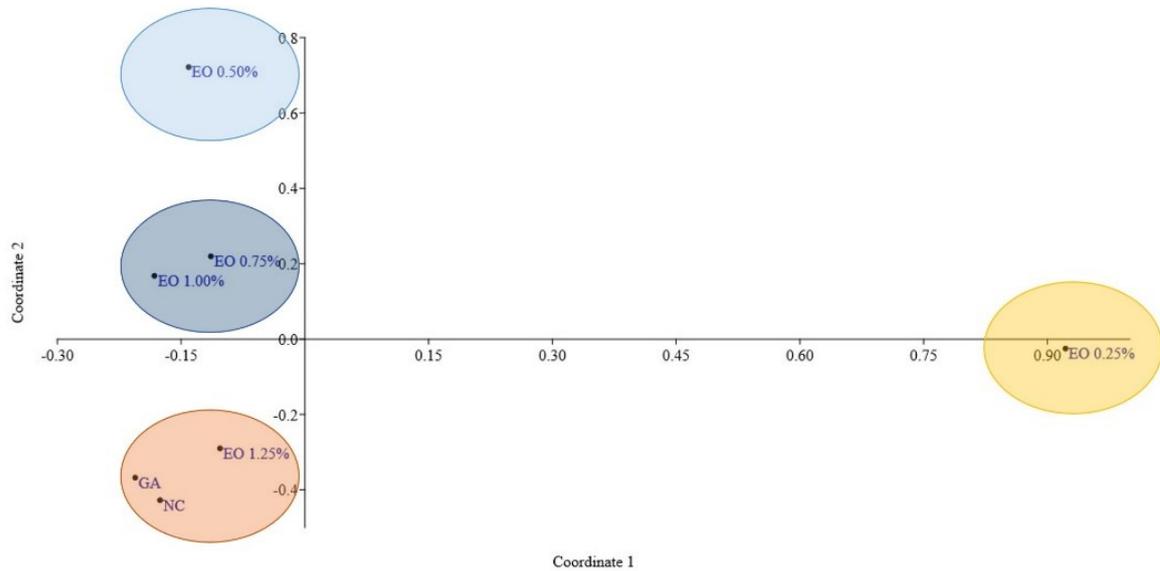
A Figura 2 apresenta o *Perfil de Diversidade* de espécies microbianas encontradas no intestino dos peixes do presente estudo. Nesse sentido, verifica-se que o grupo tratado com álcool de cereais (AC) apresentou, em contexto geral, menor diversidade do que os demais grupos.

Figura 2: Perfil de Diversidade de espécies microbianas do intestino de *Danio rerio* após 15 dias de alimentação com ração suplementada com com óleo essencial de *Lippia sidoides* a EO_{0,25%} (T1), EO_{0,50%} (T2), EO_{0,75%} (T3), EO_{1,00%} (T4) e EO_{1,25%} (T5), com ração não suplementada (controle negativo) (CN) e suplementada com álcool de cereais (AC).



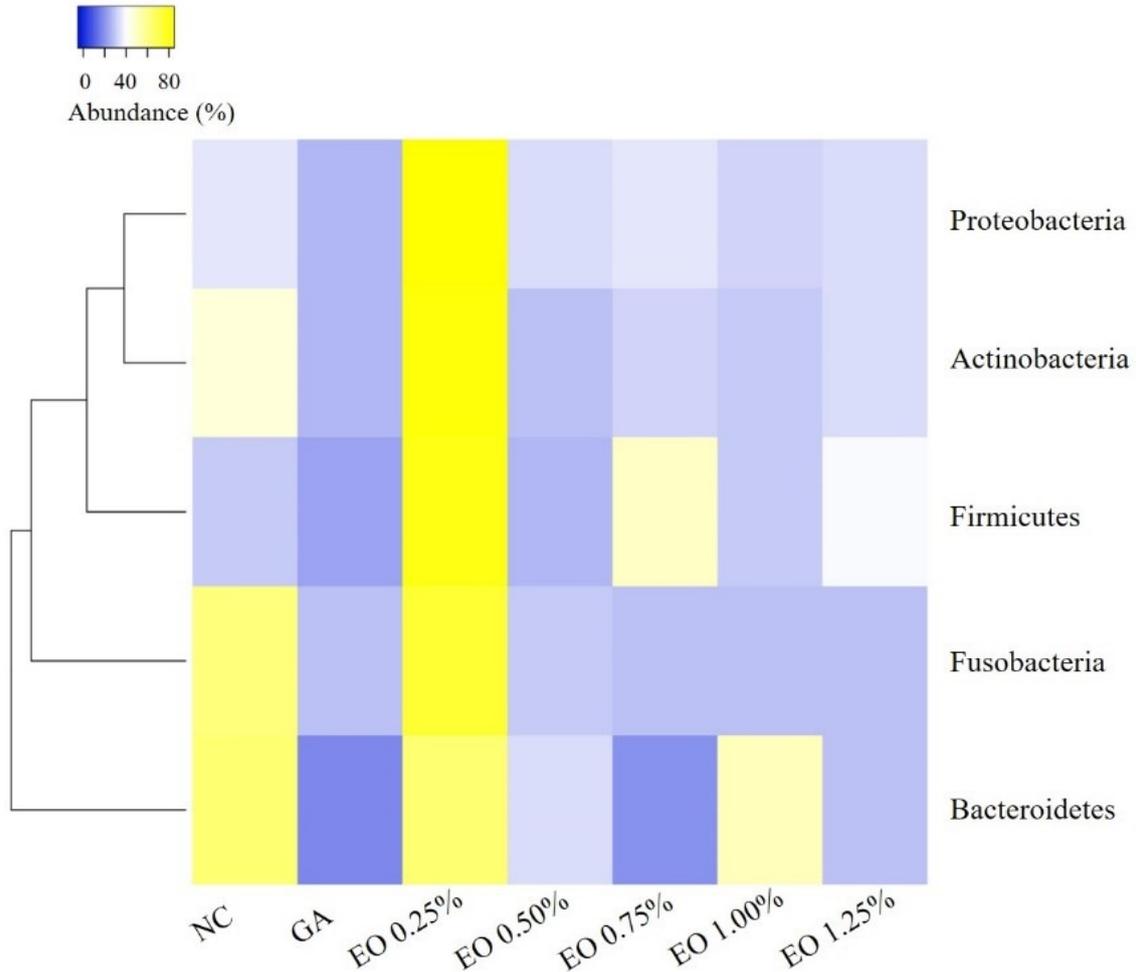
A *Análise de Coordenadas Principais (PCoA)* (Figura 3) mostrou que a composição da MI dos peixes do grupo EO_{0,25%} é consideravelmente distinta da comunidade de bactérias dos demais grupos.

Figura 3: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizada para determinar a distância métrica e ordenação das comunidades microbianas presentes no trato intestinal de *Danio rerio* após 15 dias de alimentação com ração suplementada com óleo essencial de *Lippia sidoides* a EO_{0,25%} (T1), EO_{0,50%} (T2), EO_{0,75%} (T3), EO_{1,00%} (T4) e EO_{1,25%} (T5), ou com ração não suplementada (controle negativo) CN e suplementada com álcool de cereais (AC).



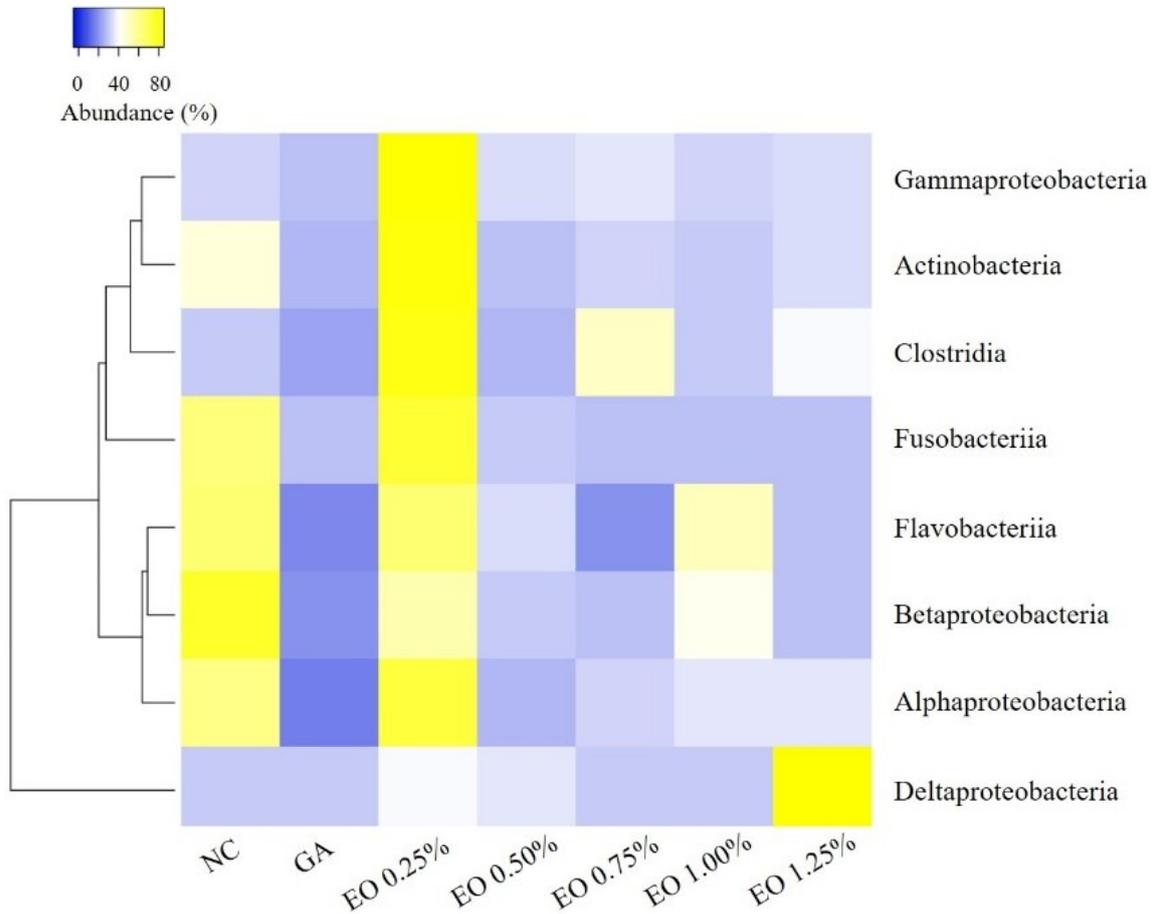
Os maiores valores de *Abundância Relativa* (%) da comunidade bacteriana, em termos de Filos (Figura 4), para Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Fusobacteria e Bacteroidetes, Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Clostridia, Fusobacteriia, Flavobacteriia, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Deltaproteobacteria, foi observada no tratamento T1, isto é, para os peixes tratados com EO_{0,25%}.

Figura 4: Mapa de calor das Abundâncias Relativas (%) a nível de Filo, agrupadas (*clustering*) pelo método de ligação média (*average linkage*) e distanciadas por *Euclidean* da microbiota intestinal de *Danio rerio* após 15 dias de alimentação com ração suplementada com óleo essencial de *Lippia sidoides* a EO_{0,25%}, EO_{0,50%}, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}, com ração não suplementada (controle negativo) (CN) e suplementada com álcool de cereais (AC).



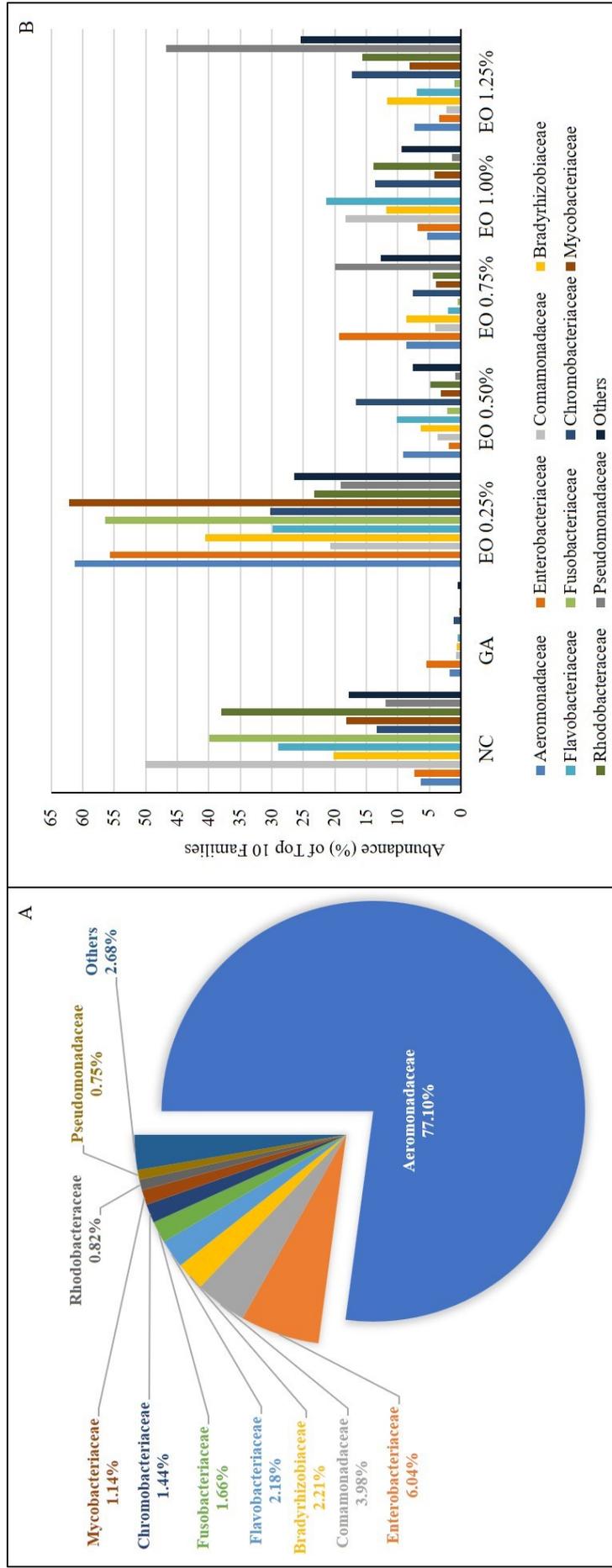
Para Classes (Figura 5), os maiores valores de *Abundância Relativa* (%) da comunidade bacteriana, para Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Clostridia, Fusobacteriia, Flavobacteriia, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Deltaproteobacteria, foram observados no tratamento EO_{0,25%}.

Figura 5: Mapa de calor das Abundâncias Relativas (%) a nível de Classe, agrupadas (*clustering*) pelo método de ligação média (*average linkage*) e distanciadas por *Euclidean* da microbiota intestinal de *Danio rerio* após 15 dias de alimentação com ração suplementada com óleo essencial de *Lippia sidoides* a EO_{0,25%}, EO_{0,50%}, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}, com ração não suplementada (controle negativo) (CN) e suplementada com álcool de cereais (AC).



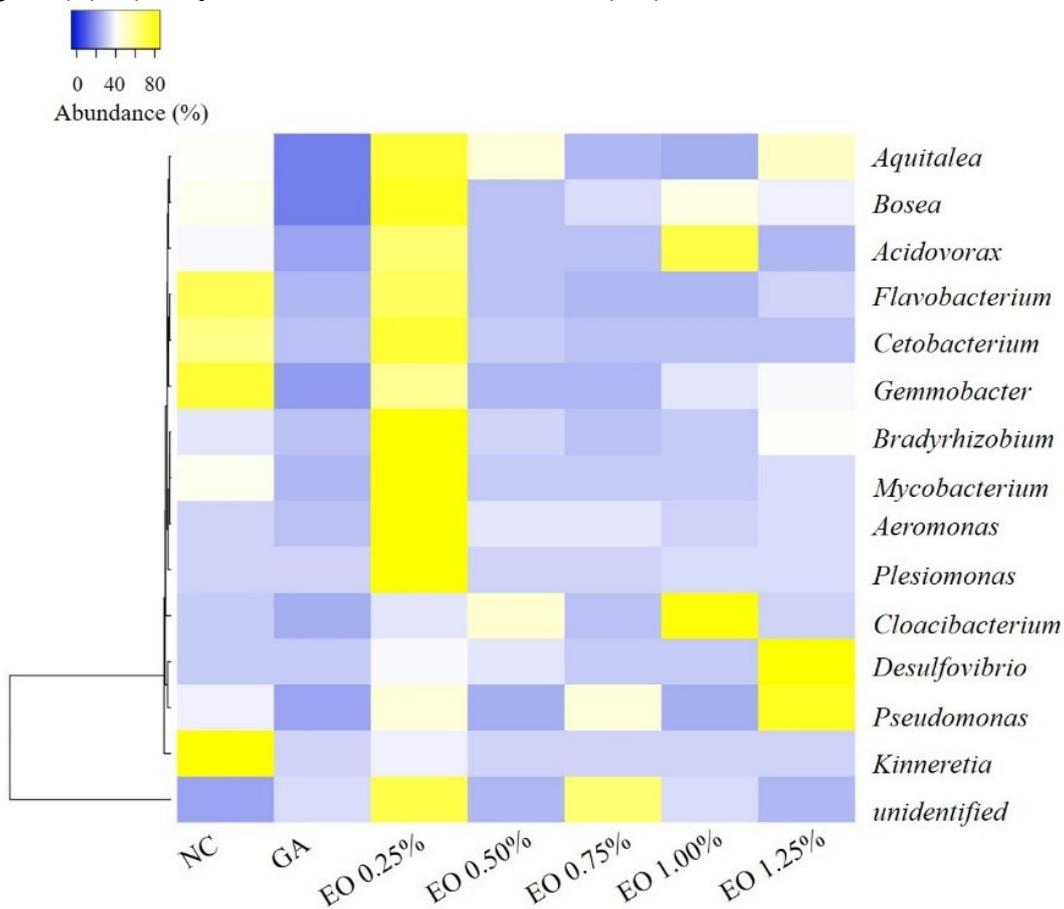
As 10 Famílias preponderantes, no que diz respeito a valores de *Abundância Relativa* (%) (Figura 6), foram *Aeromonadaceae* (77,10%), *Enterobacteriaceae* (6,04%), *Comamonadaceae* (3,98%), *Bradyrhizobiaceae* (2,21%), *Flavobacteriaceae* (2,18%), *Fusobacteriaceae* (1,66%), *Chromobacteriaceae* (1,44%), *Mycobacteriaceae* (1,14%), *Rhodobacteriaceae* (0,82%) e *Pseudomonaceae* (0,75%). Além disso, o EO_{0,25%}, quando comparado aos demais grupos, em geral, parece ter apresentado valores mais expressivos para esse índice.

Figura 6: Abundância Relativa (%) das 10 principais Famílias mais encontradas na microbiota intestinal de *Danio rerio* após 15 dias de alimentação com ração suplementada com óleo essencial de *Lippia sidoides* a EO_{0,25%}, EO_{0,50%}, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}, com ração não suplementada (controle negativo) (CN) e suplementada com álcool de cereais (AC). A - Abundância Relativa (%) das 10 principais Famílias independente do grupo experimental. B - Abundância Relativa (%) das 10 principais Famílias em função dos grupos experimentais.



A *Abundância Relativa (%)* (Figura 7) dos 15 principais Gêneros foi mais elevada, em geral, no EO_{0,25%} do que nos demais grupos. Os Gêneros encontrados foram: *Aquitalea*, *Bosea*, *Acidovorax*, *Flavobacterium*, *Cetobacterium*, *Gemmobacter*, *Bradyrhizobium*, *Mycobacterium*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Cloacibacterium*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas*, *Kinneretia* e gênero não identificado.

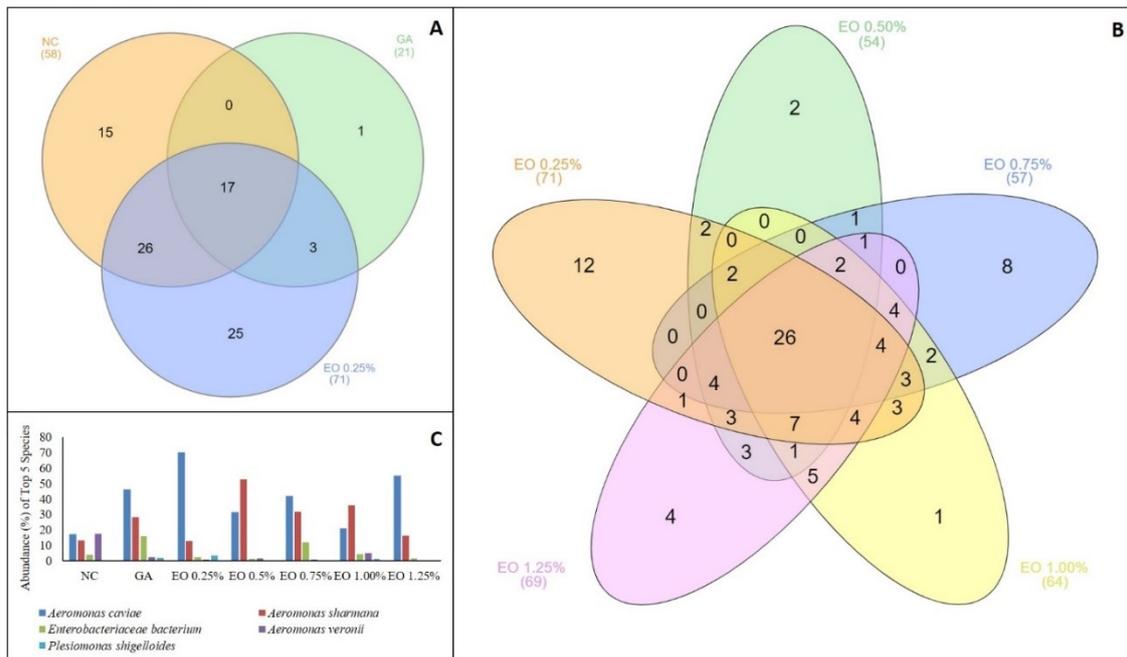
Figura 7: Mapa de calor da Abundância Relativa (%) dos 15 Gêneros mais encontrados, agrupados (*clustering*) pelo método de ligação média (*average linkage*) e distanciados por *Euclidean*, da microbiota intestinal de *Danio rerio* após 15 dias de alimentação com ração suplementada com óleo essencial de *Lippia sidoides* a EO_{0,25%}, EO_{0,50%}, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}, com ração não suplementada (controle negativo) (CN) e suplementada com álcool de cereais (AC).



A partir do *Diagrama de Venn* (Figura 8 A e B), é possível observar que, em termos de espécies singulares, CN apresentou os maiores valores (41), seguido de EO_{0,25%} (12), EO_{0,75%} (8), AC e EO_{1,25%} (4), EO_{0,50%} (2) e EO_{1,00%} (1); já em termos de espécies compartilhadas entre os grupos, observa-se que EO_{1,25%} compartilha 65 espécies com os demais grupos, seguido de EO_{1,00%} (63), EO_{1,25%} (59), EO_{0,50%} (52) e EO_{0,75%} (49). Entre si, os grupos CN e AC compartilham um total de 17 espécies.

Na Figura 8 C, verifica-se, por meio da *Abundância Relativa (%)*, que as cinco espécies preponderantes foram *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas sharmana*, *Enterobacteriaceae bacterium* e *Plesiomonas shigelloides*.

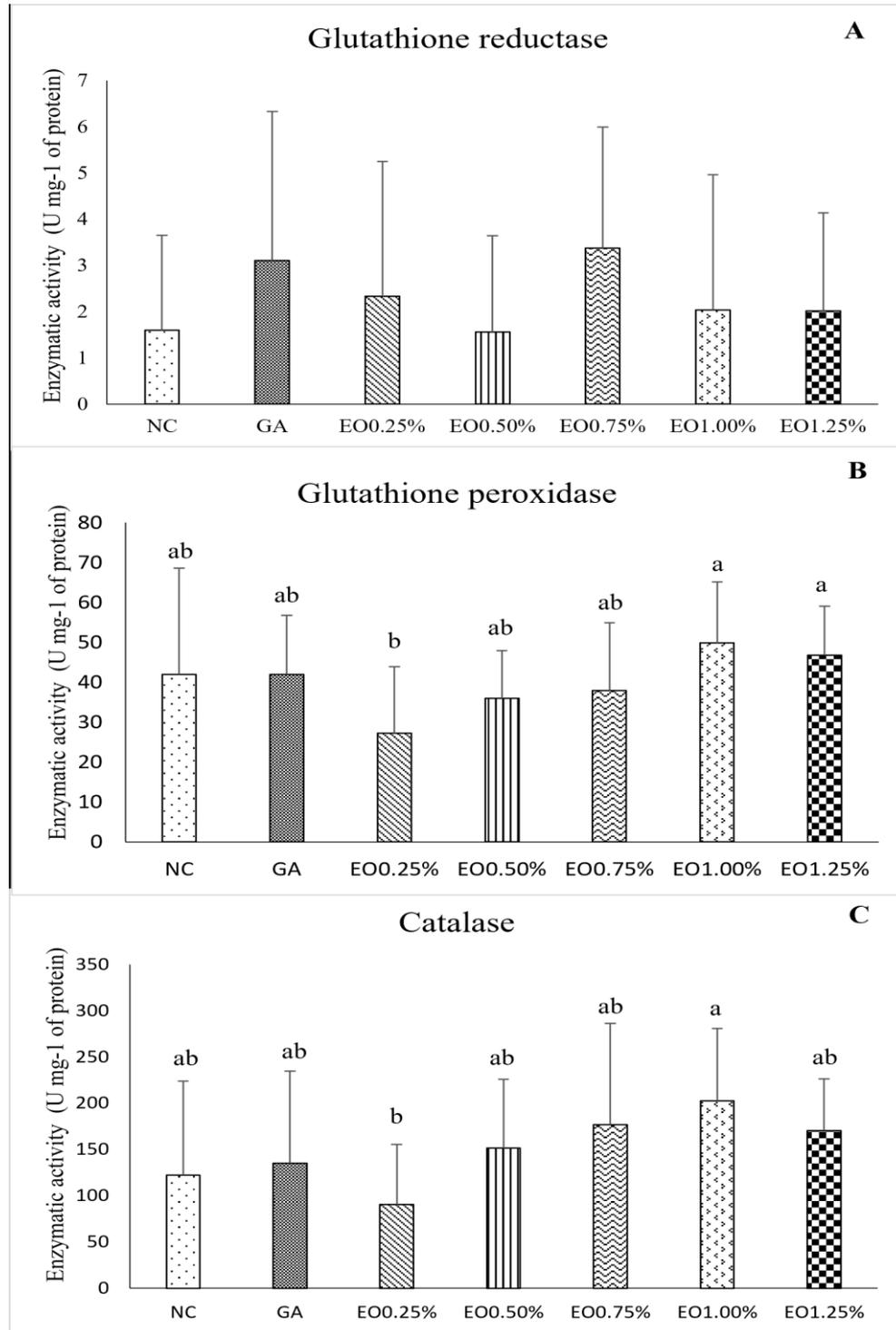
Figura 8: Diagrama de Venn e Abundância Relativa (%) a nível de Espécies da microbiota intestinal de *Danio rerio* após 15 dias de alimentação com ração suplementada com óleo essencial de *Lippia sidoides* a EO_{0,25%}, EO_{0,50%}, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}, com ração não suplementada (controle negativo) (CN) e suplementada com álcool de cereais (AC). A e B- Diagrama de Venn a nível de espécie, singulares e compartilhadas, da microbiota bacteriana. C- Abundância relativa (%) das cinco principais Espécies mais encontradas.



3.4 Análise das enzimas de estresse oxidativo

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas para a GR no fígado dos peixes alimentados com dietas contendo diferentes concentrações do LSEO (Figura 9 A). Em relação à GPx, nos animais do grupo EO_{0,25%} foram observados valores estatisticamente menores do que os reportados para aqueles dos EO_{1,00%} e EO_{1,25%} (Figura 9 B). Para a CAT, animais do tratamento EO_{0,25%} apresentaram um valor menor se comparado àqueles do EO_{1,00%} (Figura 9 C).

Figure 9: Atividade das enzimas de estresse oxidativo do fígado de *Danio rerio*. Óleo essencial de *Lippia sidoides* (OE), controle negativo (CN) e dieta suplementada somente com álcool de cereais (AC). Dados apresentados como média e desvio padrão.



3.5 Análise histológica

A partir da análise histológica, foi possível observar os seguintes resultados em relação ao fígado (Tabela 3 e Figura 10) dos animais: os tratamentos EO_{0,25%} e EO_{0,75%} apresentaram menores valores para perda do aspecto cordonal quando comparados aos do EO_{1,00%}; em EO_{0,25%} houve redução da perda da integridade do pâncreas se comparado aos grupos AC e

EO_{1,25%}; foi notada redução nos valores para núcleo com cariólise em EO_{0,25%} quando da comparação com os tratamentos EO_{1,00%}; e houve redução nos valores de núcleo com cariorrexe no EO_{0,25%} e AC em relação ao EO_{1,00%}.

Figura 10: Alterações histológicas do fígado de *Danio rerio* alimentados com óleo essencial de *Lippia sidoides*. Em “a”, observa-se a manutenção do aspecto cordonal (seta) (EO_{0,25%}); a cabeça de seta em “b” evidencia a degradação do pâncreas (EO_{1,25%}); as setas em “c” mostram a conservação da integridade dos núcleos dos hepatócitos (EO_{0,25%}); em “d”, tem-se a presença de muitos núcleos com cariólise (cabeça de seta) e cariorrexe (seta) (EO_{1,00%}).

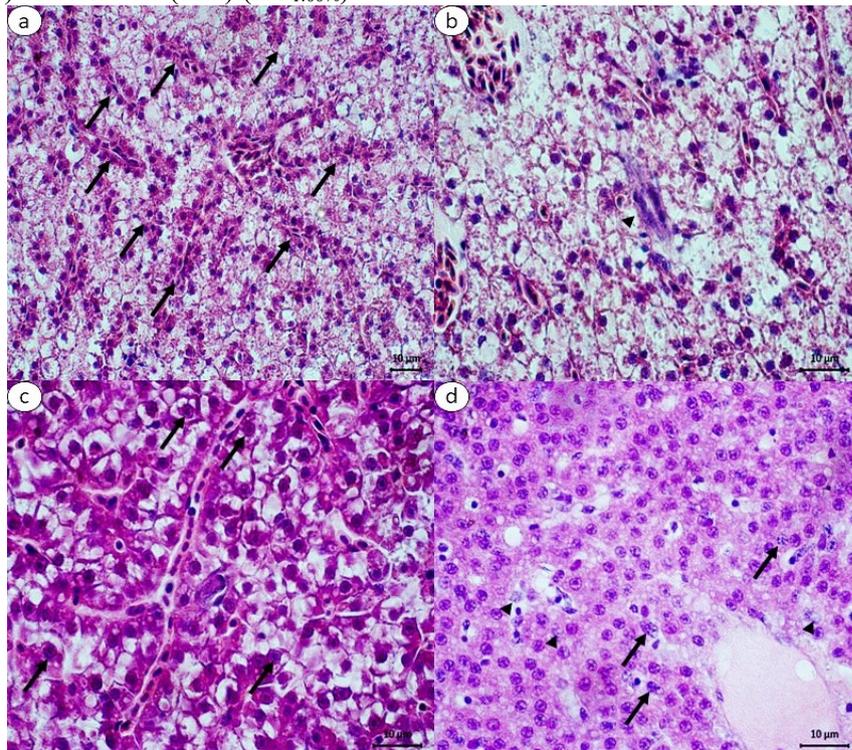


Tabela 3: Alterações histológicas do fígado de *Danio rerio*. Óleo essencial de *Lippia sidoides* (LSEO), controle negativo (CN) e dieta suplementada somente com álcool de cereais (AC). Dados apresentados como média e desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$).

Alteração histológica	CN	AC	EO _{0.25%}	EO _{0.50%}	EO _{0.75%}	EO _{1.00%}	EO _{1.25%}	p value
Perda do aspecto cordonal	79.17±14.43 ^{ab}	72.92±7.22 ^{ab}	68.75±15.54 ^b	79.17±14.43 ^{ab}	68.75±11.31 ^b	83.33±12.31 ^a	75.00±0.00 ^{ab}	0.022
Perda da uniformidade do tamanho de células e núcleos	52.08±19.82	56.25±24.13	54.17±23.44	54.17±23.44	52.08±27.09	43.75±24.13	43.75±18.84	0.746
Perda da integridade do pâncreas	47.92±7.22 ^{ab}	54.17±9.73 ^a	39.58±16.71 ^b	50.00±23.44 ^{ab}	50.00±10.66 ^{ab}	50.00±0.00 ^{ab}	52.08±7.22 ^a	0.010
Presença de dutos biliares	0.67±0.49	0.42±0.51	0.50±0.52	0.58±0.00	0.58±0.51	0.67±0.49	0.75±0.45	0.729
Aspecto balonoso	45.83±23.44	45.83±17.94	50.00±21.31	52.08±0.51	43.75±28.45	45.83±23.44	1.67±22.19	0.941
Congestão de grandes vasos	66.67±22.19	54.17±27.87	47.92±19.82	58.33±0.00	50.00±30.15	52.08±24.91	0.42±22.51	0.510
Congestão do pâncreas	33.33±22.19	33.33±19.46	29.17±14.43	37.50±19.46	27.08±22.51	22.92±24.91	43.75±15.54	0.224
Congestão dos sinusoides	29.17±9.73	33.33±16.28	35.42±12.87	33.33±19.94	27.08±7.22	35.42±16.71	33.33±12.31	0.687
Deslocamento do núcleo dos hepatócitos	50.00±18.46	54.17±25.75	54.17±25.75	43.75±0.00	45.83±31.68	43.75±33.92	45.83±20.87	0.901
Dilatação dos sinusoides	31.25±11.31	37.50±19.94	27.08±16.71	25.00±24.13	29.17±14.43	22.92±12.87	25.00±0.00	0.124
Infiltrado eosinofílico	2.08±7.22	6.25±11.31	2.08±7.22	2.08±0.00	6.25±11.31	4.17±9.73	0.00±0.00	0.482
Infiltrado linfocitário	6.25±11.31	6.25±11.31	0.00±0.00	6.25±7.22	12.50±22.61	8.33±12.31	0.00±0.00	0.212
Hipertrofia dos hepatócitos	50.00±18.46	39.58±16.71	47.92±19.82	43.75±15.54	43.75±24.13	39.58±27.09	37.50±22.61	0.776
Hipertrofia do núcleo dos hepatócitos	29.17±9.73	25.00±0.00	20.83±14.43	27.08±21.65	25.00±0.00	22.92±12.87	22.92±12.87	0.457
Macrosteatose	14.58±19.82	14.58±16.71	22.92±27.09	8.33±7.22	25.00±21.32	6.25±11.31	18.75±18.84	0.186
Microsteatose	27.08±22.51	22.92±29.11	29.17±25.75	14.58±19.46	25.00±21.32	6.25±11.31	18.75±15.54	0.140
Necrose	52.08±16.71	41.67±16.28	43.75±15.54	39.58±19.82	41.67±22.19	31.25±15.54	41.67±22.19	0.342
Núcleo com picnose	35.42±12.87	27.08±7.22	27.08±7.22	27.08±27.09	25.00±0.00	27.08±7.22	31.25±11.31	0.062
Núcleo com cariólise	27.27±7.54 ^{ab}	25.00±0.00 ^{ab}	22.92±7.22 ^b	25.00±7.22 ^{ab}	25.00±0.00 ^{ab}	31.25±11.31 ^a	25.00±0.00 ^{ab}	0.027
Núcleo com cariorrexe	27.08±7.22 ^{ab}	22.92±7.22 ^b	22.92±7.22 ^b	25.00±0.00 ^{ab}	25.00±0.00 ^{2ab}	31.25±11.31 ^{2a}	25.00±0.00 ^{2ab}	0.032

No rim (Tabela 4 e Figura 11), foram feitos os seguintes registros: redução da degeneração granular em EO_{0,25%} se comparado ao EO_{0,50%}; diminuição da degeneração tubular em EO_{0,25%}, se comparado a EO_{1,25%}; e redução da dilatação dos capilares nos glomérulos em AC e EO_{0,25%} se comparado ao CN e EO_{1,25%}.

Figura 11: Alterações histológicas do rim de *Danio rerio* alimentados com com óleo essencial de *Lippia sidoides*. Em “a”, observa-se a manutenção da integridade dos túbulos (seta) (EO_{0,25%}); os asteriscos em “b” evidenciam degeneração granular (EO_{0,50%}); a seta em “c” mostra a conservação da integridade dos glomérulos, sem dilatação dos capilares (EO_{0,25%}); em “d”, tem-se a presença de dilatação dos capilares glomerulares (cabeça de seta) (CN).

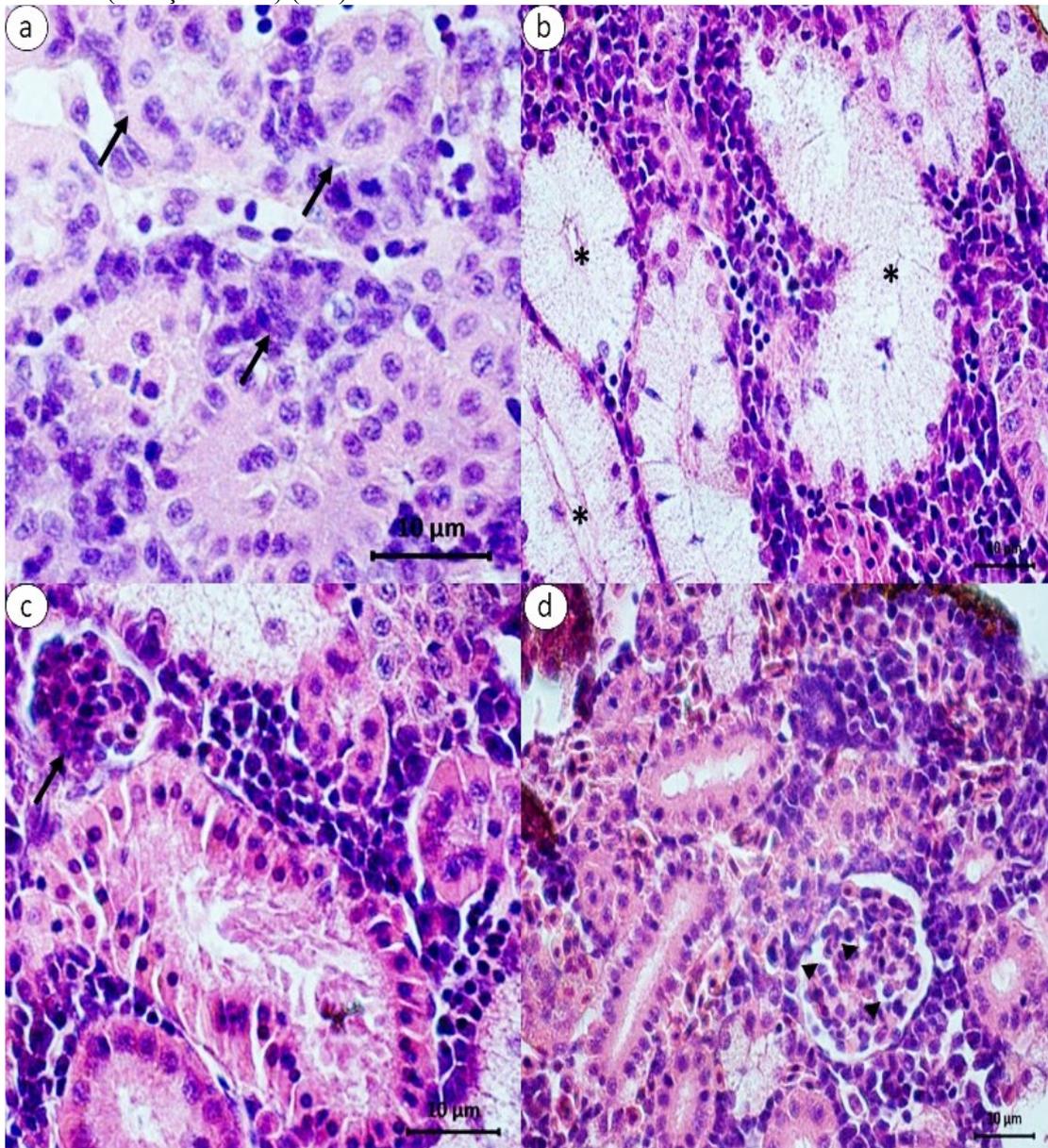


Tabela 4: Alterações histológicas do rim de *Danio rerio*. Óleo essencial de *Lippia sidoides* (LSEO), controle negativo (CN) e dieta suplementada somente com álcool de cereais (AC). Dados apresentados como média e desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$).

Alteração histológica	NC	GA	EO _{0,25%}	EO _{0,50%}	EO _{0,75%}	EO _{1,00%}	EO _{L25%}	p value
Degeneração granular	61.36±13.06 ^{ab}	58.33±16.28 ^{ab}	37.50±25.00 ^b	68.75±11.31 ^a	43.75±21.65 ^b	52.08±19.82 ^{ab}	45.83±24.75 ^{ab}	0.005
Hipertrofia celular	45.45±15.08	37.50±13.06	31.25±18.84	43.75±11.31	39.58±16.71	39.58±16.71	33.33±12.31	0.315
Hipertrofia nuclear	29.55±10.11	29.17±9.73	29.17±14.43	33.33±12.31	35.42±16.71	29.17±9.73	27.08±7.22	0.659
Vacuolização celular	2.27±7.54	4.17±9.73	4.17±14.43	0.00±0.00	4.17±9.73	0.00±0.00	0.00±0.00	0.565
Dilatação da luz tubular	27.27±7.54	22.92±16.71	18.75±11.31	27.08±7.22	22.92±7.22	27.08±12.87	22.92±7.22	0.390
Túbulos em regeneração	6.82±16.17	6.25±11.31	6.25±11.31	8.33±12.31	8.33±12.31	8.33±12.31	4.17±9.73	0.972
Rompimento celular	50.00±15.81	37.50±13.06	33.33±24.62	54.17±17.94	39.58±22.51	41.67±22.19	35.42±16.71	0.129
Degeneração hialina	2.27±7.54	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.432
Oclusão da luz tubular	27.27±7.54	31.25±11.31	22.92±12.87	35.42±12.87	29.17±14.43	25.00±0.00	31.25±11.31	0.148
Degeneração tubular	40.91±16.85 ^{ab}	35.42±12.87 ^{ab}	27.08±7.22 ^b	41.67±12.31 ^{ab}	45.83±9.73 ^a	35.42±12.87 ^{ab}	45.83±9.73 ^a	0.002
Novos néfrons	9.09±23.11	6.25±11.31	6.25±11.31	4.17±9.73	8.33±12.31	0.00±0.00	0.00±0.00	0.264
Dilatação dos capilares	20.45±18.77 ^a	6.25±11.31 ^b	4.17±9.73 ^b	16.67±12.31 ^{ab}	12.50±13.06 ^{ab}	14.58±12.87 ^{ab}	20.83±17.94 ^a	0.020
Espessamento do endotélio capilar	38.64±32.33	18.75±33.92	35.42±37.63	50.00±31.98	37.50±39.17	41.67±37.44	45.83±35.09	0.456
Aumento do volume glomerular	36.36±30.84	14.58±27.09	22.92±24.91	37.50±22.61	22.92±24.91	27.08±24.91	31.25±24.13	0.266
Redução do espaço de Bowman	4.55±10.11	0.00±0.00	0.00±0.00	2.08±7.22	4.17±9.73	2.08±7.22	6.25±15.54	0.540
Presença de eritrócitos	27.27±23.60	14.58±27.09	22.92±24.91	35.42±22.51	22.92±24.91	29.17±27.87	27.08±22.51	0.542
Infiltrado linfocitário	2.27±7.54	0.00±0.00	4.17±9.73	2.08±7.22	2.08±7.22	0.00±0.00	0.00±0.00	0.550

Com relação às alterações no baço (Tabela 5 e Figura 12), observaram-se os seguintes resultados: redução da necrose nos grupos EO_{0,25%}, EO_{0,50%} e EO_{1,00%} se comparado ao AC; diminuição da esteatose em EO_{0,50%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%} se comparado ao EO_{0,75%}.

Figura 12: Alterações histológicas do baço de *Danio rerio* alimentados com com óleo essencial de *Lippia sidoides*. Em “a”, observa-se a presença de um baço normal (EO_{0,25%}); o asterisco em “b” evidencia a presença de necrose (AC); em “c”, mostra-se um baço normal, apenas com artefato de técnica (setas) (EO_{0,25%}); em “d”, tem-se a presença de esteatose (cabeça de seta) (EO_{0,75%}).

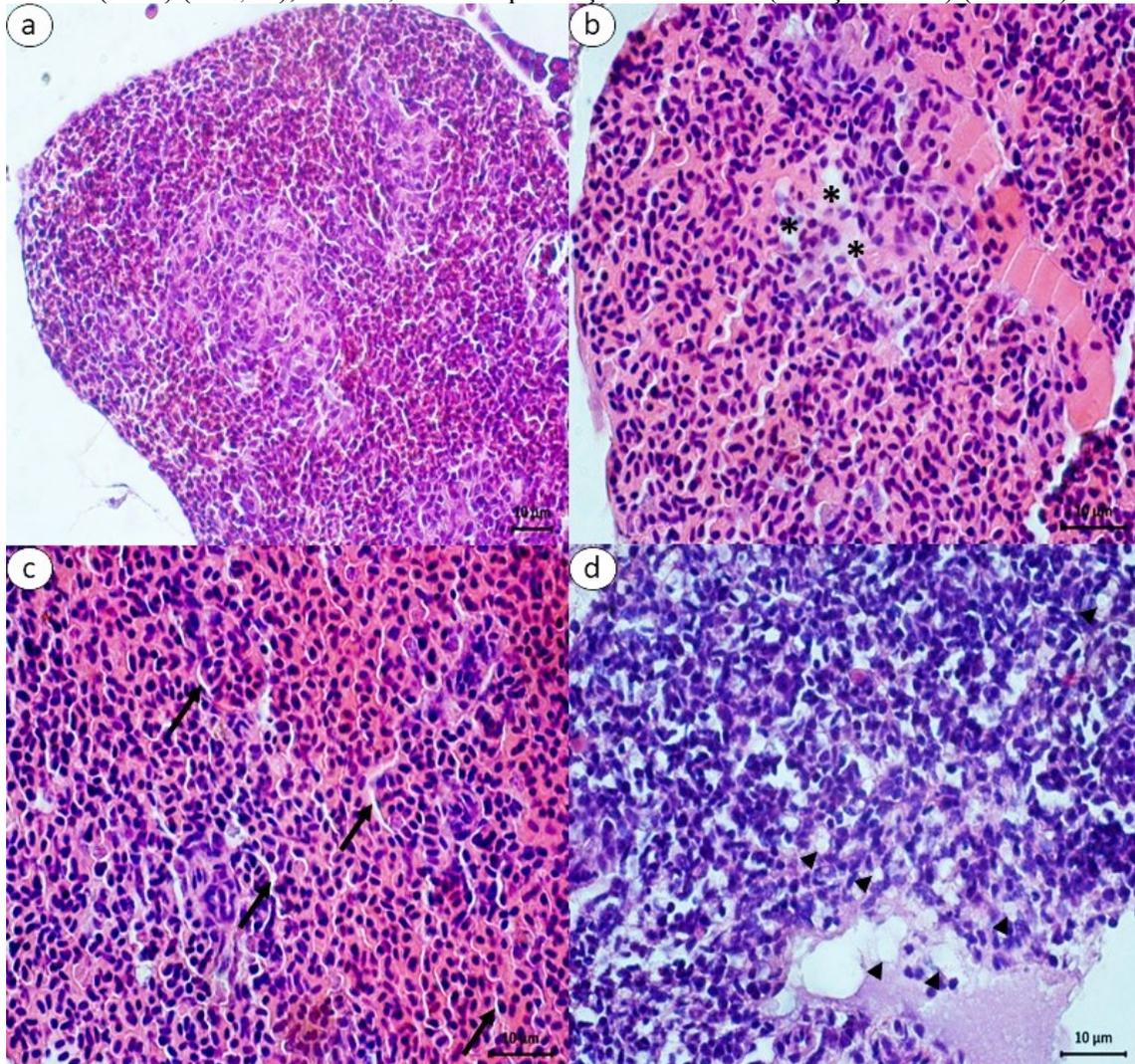


Tabela 5: Alterações histológicas do baço de *Danio rerio*. Óleo essencial de *Lippia sidoides* (LSEO), controle negativo (CN) e dieta suplementada somente com álcool de cereais (AC). Dados apresentados como média e desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais pelo Teste de Duncan ($p < 0.05$).

Alteração histológica	CN	AC	EO_{0,25%}	EO_{0,50%}	EO_{0,75%}	EO_{1,00%}	EO_{1,25%}	p value
Perda da integridade da polpa branca	20.83±23.44	14.58±22.51	10.420±16.71	6.25±11.31	20.83±20.87	2.08±7.22	12.50±16.85	0.249
Perda da integridade da polpa vermelha	20.83±23.44	14.58±22.51	10.420±16.71	6.25±11.31	20.83±20.87	2.08±7.22	12.50±16.85	0.249
Perda da integridade da cápsula fibrosa	0.00±0.00	2.08±7.22	2.08±7.22	8.33±12.31	6.25±11.31	2.08±7.22	12.50±16.85	0.080
Centros de melanomacrófagos	20.83±14.43	29.17±14.43	20.83±9.73	18.75±11.31	25.00±15.08	20.83±9.73	25.00±0.00	0.628
Melanomacrófagos soltos	25.00±10.66	29.17±17.94	22.92±7.22	25.00±0.00	35.42±19.82	25.00±0.00	25.00±0.00	0.518
Necrose	27.08±16.71 ^{ab}	35.42±19.82 ^a	14.58±19.82 ^b	10.42±16.71 ^b	22.92±19.82 ^{ab}	10.42±12.87 ^b	22.92±16.71 ^{ab}	0.033
Infiltrado eosinofílico	2.08±7.22	6.25±11.31	2.08±7.22	0.00±0.00	2.08±7.22	6.25±11.31	2.08±7.22	0.279
Infiltrado linfocitário	2.08±7.22	4.17±9.73	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.17±9.73	2.08±7.22	0.277
Congestão	12.50±22.61	14.58±27.09	12.50±22.61	14.58±16.71	20.83±20.87	10.42±22.51	10.42±22.51	0.487
Esteatose	10.42±22.51 ^{ab}	6.25±21.65 ^{ab}	10.42±19.82 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	10.42±12.87 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.022

No intestino (Tabela 6 e Figura 13), houve aumento do número de vilos em EO_{0,25%}, quando comparado a todos os demais grupos; elevação dos valores relacionados ao comprimento dos vilos no grupo EO_{0,25%}, em relação aos tratamentos CN, AC, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}; aumento da largura dos vilos em EO_{0,25%} e EO_{1,00%} em comparação com o AC; e aumento do número de células caliciformes e da área dos vilos em EO_{0,25%} se comparado a todos os demais grupos.

Figura 13: Alterações histológicas do intestino de *Danio rerio* alimentados com com óleo essencial de *Lippia sidoides*. Em “a”, observa-se órgão com vilos menos numerosos (CN); as setas em “b” evidenciam o aumento do número, comprimento e largura dos vilos (EO_{0,25%}); as cabeças de setas em “c” mostram a reduzida quantidade de células caliciformes (CN); em “d”, tem-se a presença de vilos com grande quantidade de células caliciformes (cabeça de seta) (EO_{0,25%}).

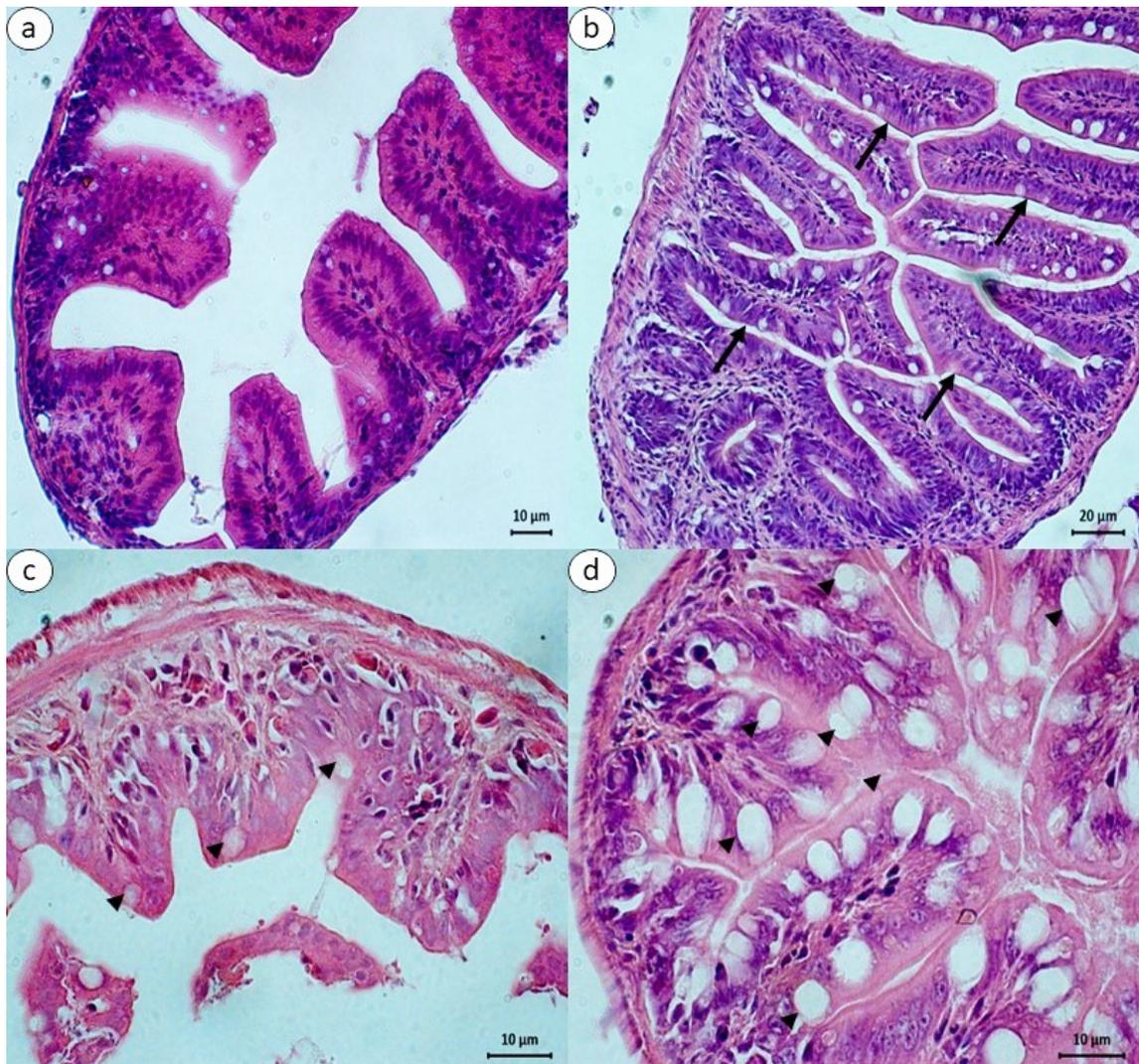


Tabela 6: Alterações histomorfológicas da porção média do intestinal de *Danio rerio*. Óleo essencial de *Lippia sidoides* (LSEO), controle negativo (CN) e dieta suplementada somente com álcool de cereais (AC). Dados apresentados como média e desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$).

Alterações histomorfológicas	NC	AC	EO _{0.25%}	EO _{0.50%}	EO _{0.75%}	EO _{1.00%}	EO _{1.25%}	p value
Nº de vilos	16.75±5.71 ^b	15.92±5.05 ^{bc}	25.08±7.80 ^a	10.25±2.30 ^c	15.25±4.33 ^{bc}	12.50±2.75 ^{bc}	15.33±3.14 ^{bc}	0.000
Comprimento dos vilos (µm)	65.82±23.39 ^d	63.71±26.41 ^d	125.00±27.45 ^a	121.63±13.22 ^{ab}	95.45±24.46 ^{bc}	93.73±21.73 ^c	87.02±6.05 ^{cd}	0.000
Largura dos vilos (µm)	38.44±13.97 ^{ab}	34.25±20.21 ^b	53.13±13.32 ^a	50.18±5.19 ^{ab}	49.47±14.44 ^{ab}	51.27±11.60 ^a	39.29±3.82 ^{ab}	0.001
Nº de células caliciformes	66.33±11.42 ^{bc}	71.08±31.69 ^{bc}	124.31±42.02 ^a	72.00±14.94 ^{bc}	86.92±28.44 ^b	48.25±11.47 ^c	69.58±11.33 ^{bc}	0.000
Área	98925.96±	359795.18±	411346.26±	177558.94±	245221.14±	222321.66±	244950.15±	0.000
	39698.67 ^c	213087.77 ^{ab}	187835.02 ^a	84709.87 ^c	91069.81 ^{bc}	87688.22 ^{bc}	78083.48 ^{bc}	
Perímetro	6108.53±	11104.46±	240856.81±	6196.71±	8427.70±	7614.76±	8685.14±	0.395
	2314.45	4828.74	783667.48	2100.62	2348.05	1943.54	2171.60	
Infiltrado eosinofílico	31.25±21.65	33.33±22.19	33.33±19.46	35.42±16.71	37.50±27.18	29.17±9.73	33.33±12.31	0.964
Infiltrado linfocitário	16.67±12.31	8.33±12.31	2.08±7.22	10.42±12.87	14.58±19.82	12.50±13.06	14.58±12.87	0.148
Melanomacrófagos	2.08±7.22	4.17±9.73	0.00±0.00	0.00±0.00	2.08±7.22	0.00±0.00	0.00±0.00	0.350
Necrose	45.83±20.87	31.25±21.65	25.00±21.32	25.00±21.32	39.58±22.51	41.67±24.62	35.42±19.82	0.139
Vacuolização	39.58±27.09	33.33±24.62	27.08±22.51	22.92±22.51	39.58±27.09	43.75±21.65	39.58±22.51	0.311

4. Discussão

4.1 Composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides*

Os constituintes químicos do LSEO, em termos de tipos e concentrações, podem variar em função dos efeitos edafoclimáticos e da metodologia de extração empregada (Lima et al., 2011). Outros fatores, ainda, também são importantes para o rendimento e a composição dessas substâncias comumente extraídas de ervas e especiarias, a exemplo da hora da coleta, do ciclo vegetativo e dos cuidados no preparo da matéria-prima vegetal (Miraldi, Giachetti & Ferri, 2001; De Vasconcelos Silva et al., 1999). Essas informações auxiliam a elucidar o motivo pelo qual é possível observar que naturalmente ocorrem as semelhanças e as diferenças no perfil desses óleos essenciais, frequentemente reportadas por diferentes autores.

Tal como o relatado no presente trabalho, os constituintes predominantes do LSEO foram: timol (87,90%) o ρ -cimeno (5,33%) (Araújo Marco et al., 2012); timol (80,8%), ρ -cimeno (8,6%) e (E)-cariofileno (5,1%) (Cavalcanti et al., 2004); e timol (59,65%) e o (E)-cariofileno (10,60%) (Fontenelle et al., 2007). Há registros, todavia, que evidenciam como majoritários outros compostos do óleo essencial dessa espécie, tais quais: carvacrol (31,68%), ρ -cimeno (19,58%), 1,8-cineol (9,26%) e o γ -terpineno (9,21%) (Lima et al., 2011); carvacrol (26,44%) e 1,8-cineol (22,63%) (Guimarães et al., 2014); e carvacrol (46,09%), γ -terpineno (15,49%) e ρ -cimeno (15,06) (Cavalcanti et al., 2010).

A importância de se conhecer os constituintes dos óleos essenciais reside no fato de que o seu efeito sobre a saúde dos animais está intrinsecamente atrelado à configuração do tipo e da concentração desses compostos, bem como ao sinergismo que acontece a partir de suas interações (Lima et al., 2011). Segundo Bakkali et al. (2008), o efeito dos OE sobre a saúde animal está fortemente relacionado ao tipo e concentração dos constituintes químicos, bem como à atividade biológica que, por sua vez, é determinada pelos componentes mais abundantes.

4.2 Efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* na microbiota do trato intestinal de *Danio rerio*

Embora a literatura evidencie a existência do efeito sinérgico dos compostos majoritários e minoritários dos óleos essenciais (Didry et al., 1993; Hyldgaard et al., 2012), há que se destacar também a importância individual de alguns constituintes presentes em maior quantidade. De acordo com Bakkali et al. (2008), a atividade biológica do óleo essencial é determinada pelos seus componentes mais abundantes.

O timol, por exemplo, cuja concentração foi de 72,2% no LSEO utilizado no presente trabalho, possui capacidade de desintegrar a membrana de bactérias gram-negativas, a exemplo

de *Aeromonas hydrophila*, desnaturando enzimas essenciais, disponibilizando lipopolissacarídeos e elevando a permeabilidade e a despolarização da membrana citoplasmática, ao alterar a força elétron-motora por meio de variações no pH e no potencial elétrico (Burt, 2004; & Xu et al., 2008); o ρ -cimeno, com concentração de 8,1% no composto utilizado, embora menos eficaz que outros fitoconstituintes, possui atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e auxilia aumentando o potencial antimicrobiano de outros constituintes, por meio de interações sinérgicas e aditivas (Marchese et al., 2017; & De Almeida Rocha et al., 2022). Segundo Yang et al. (2014), ao atuar em combinação com linalol, terpinen-4-ol, terpinenol, o ρ -cimeno apresentou efeitos aditivos contra *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguinis* e *S. mutans*; o (E)-cariofileno, com concentração de 4,9% no LSEO do nosso trabalho, possui propriedades anti-inflamatórias e é utilizado como anestésico local (Ghelardini et al., 2001; Gertsch et al., 2008).

Embora o potencial dos óleos essenciais sobre a MI dos animais seja reconhecido (Bento et al., 2013), a suplementação dietária com *L. sidoides* não promoveu, no presente estudo, diferenças significativas na contagem microbiológica do trato intestinal de *Danio rerio* em termos de *Pseudomonas* sp. (Cetrimide), bactérias ácido-láticas totais (MRS), bactérias heterotróficas totais (TSA) e Vibrionaceae (TCBS) entre os grupos analisados. Mudanças provocadas na configuração da fauna bacteriana podem estar relacionadas, dentre outros fatores, ao tempo de suplementação dietária. Nesse contexto, após 8 semanas de alimentação com óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) na dieta para carpa *Cyprinus carpio*, Zhang et al. (2020) sugeriram que o aumento da atividade das enzimas digestivas e da capacidade antioxidante, o estímulo ao efeito imunomodulador e a elevação da resistência a doenças podem estar relacionados a alterações na estrutura da MI provocadas pelo óleo essencial. É possível, portanto, que o período de 15 dias utilizado para suplementação dietária com o óleo essencial de alecrim-pimenta não tenha sido suficiente para imprimir mudanças significativas na contagem microbiológica.

4.3 Riqueza, diversidade e abundância da microbiota intestinal

Semelhante ao observado no presente estudo, He et al. (2017) relataram, com base nos valores de OTUs, aumento da riqueza e diversidade de espécies da MI de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dieta contendo ácido orgânico e óleo essencial. Embora Huyben et al. (2021) não tenham confirmado diferenças estatísticas significativas de OTUs para trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com dieta contendo óleo essencial e aquelas do grupo

controle, sugerem que produtos como ácidos orgânicos e óleos essenciais aumentam a saúde intestinal de espécies aquáticas, por meio da regulação da comunidade microbiana.

Para Henao-Mejia et al. (2012) e Ma et al. (2017), a MI é um ecossistema complexo e capaz de afetar as condições fisiológicas, imunológicas, nutricionais e metabólicas do hospedeiro. Os constituintes dos óleos essenciais possuem propriedades lipofílicas, capazes de transpor a membrana das bactérias e atingir o meio intracelular. Nesse contexto, essas substâncias desempenham importante função na elevação do número de bactérias probióticas e na diversidade da MI dos animais (Helander et al., 1998).

A redução dos valores de riqueza de espécies de bactérias no trato intestinal dos peixes alimentados com dieta contendo álcool de cereais é um resultado que vai ao encontro do reportado por Silva et al. (2012), que verificaram maior efetividade de própolis contra bactérias quando esse composto foi extraído com o solvente álcool de cereais. Esse tipo de álcool é um etanol, comumente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, para citar alguns exemplos, e pode atuar na desnaturação de proteínas e dissolução de lipídios, fato que possivelmente levou à diminuição da riqueza de bactérias na MI dos peixes desse grupo de tratamento, em comparação com os demais.

Por meio da análise PCoA, ferramenta que mede a similaridade entre as comunidades bacterianas baseada na distância filogenética, o perfil da comunidade de bactérias da MI de *D. rerio* alimentados com EO_{0,25%} variou substancialmente daquele registrado para os demais grupos. Semelhantemente ao reportado por nós, Ran et al. (2016) também relataram que os índices de diversidade da comunidade microbiana do intestino foram mais elevados nos juvenis de tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) que receberam, durante seis semanas, suplementação dietária com um tipo específico de óleo essencial contendo concentrações equivalentes de timol e carvacrol (NE) (200-mg NE/Kg) do que naqueles do grupo controle. Os autores afirmam maior dominância do Filo Proteobacteria e do Gênero *Plesiomonas* e menor abundância relativa de *Bacteroides*, *Candidatus Cardinium* e *Leptospirillum* no grupo NE do que no controle. Adicionalmente, Zhang et al. (2020) relataram que a comunidade bacteriana de *C. carpio* alimentadas com dieta contendo óleo essencial de orégano (4500 mg kg⁻¹) foi distinta da do grupo controle, porém, para as carpas desse estudo, os gêneros mais enriquecidos foram *Propionibacterium*, *Brevinema* e *Corynebacterium_1* nos animais suplementados e *Vibrio* nos controle. A contagem de *V. vulnificus*, *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, tanto no músculo quanto no hepatopâncreas de camarões *Litopenaeus vannamei*, também demonstrou a capacidade que a suplementação dietária com óleo essencial de orégano (com elevados teores de timol e carvacrol) possui de alterar a fauna bacteriana, inclusive por meio da inibição do

crescimento dessas espécies de *Vibrio* (Gracia-Valenzuela et al., 2014). De modo análogo ao presente estudo, Li et al. (2018) observaram que o leitões alimentados com dieta contendo timol e carvacrol tiveram a comunidade microbiana intestinal alterada, embora sem diferenças na riqueza e diversidade entre os grupos tratados e controle.

De acordo com Carda-Dieguez, Mira & Fouz (2014), é possível que a administração de curto prazo de dietas contendo óleos essenciais cause mudanças transitórias na MI, sugerindo que a diferença entre a diversidade de bactérias alóctones e autóctones pode estar ligada ao conteúdo fecal, ou melhor, ao número de bactérias associadas ao muco; no caso deles, a Família Bradyrhizobiaceae (Classe Alphaproteobacteria) foi o grupo bacteriano predominante em *Dicentrarchus labrax*.

Desse modo, é possível que no presente trabalho, a concentração do EO_{0,25%} tenha melhorado a composição da mucosa intestinal e, conseqüentemente, possibilitado o desenvolvimento da comunidade bacteriana intestinal de *D. rerio* desse tratamento. O aumento dos valores de diversidade e abundância relativa da MI dos peixes desse grupo também pode estar condicionado à alteração da estrutura da MI em decorrência da maior atividade das enzimas digestivas e da elevação dos valores de atividade imunológica (Zhang et al., 2020). A atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-helmintica do LSEO está relacionada aos monoterpenos timol e ρ -cimeno (Vazquez-Sanchez et al., 2018). Outros fatores que podem ter afetado, direta ou indiretamente, a composição da fauna de bactérias nos peixes do nosso estudo podem estar relacionados ao possível melhor aproveitamento do alimento fornecido em decorrência do aumento da palatabilidade provocado pela suplementação com óleo essencial de *L. sidoides* (Steiner & Encarnação, 2010; & Abdel-Latif & Khalil, 2014).

Em contexto geral, os menores valores de abundância relativa, em nível de Filo, Classe, Família e Gênero, observados nos demais tratamentos podem estar relacionados a um possível efeito tóxico para os peixes. De acordo com Lee et al. (2003), os óleos essenciais carregam metabólitos secundários voláteis com baixo peso molecular e propriedade seletiva sobre a microbiota. É possível que as concentrações mais altas (EO_{0,50%}, EO_{0,75%}, EO_{1,00%} e EO_{1,25%}) do LSEO tenham provocado efeito deletério sobre a comunidade bacteriana do trato intestinal de *D. rerio*, na medida em que possam ter ultrapassado a parede celular, afetado a permeabilidade da membrana e provocado danos ao sistema enzimático, associados à redução de íons, depleção do potencial de membrana, colapso da bomba de próton e ao esgotamento do *pool* de ATP, dificultando sua reprodução e ocasionando a morte bacteriana (Bakkali et al., 2008). Para Souza et al. (2019), a eficácia e as atividades biológicas dos óleos essenciais estão relacionadas a composição, concentração e/ou quimiotipo utilizado, devendo ser empregadas ações espécie-

específicas, haja vista que essas substâncias podem ocasionar estresse nos hospedeiros se as concentrações e os quimiotipos não estiverem adequados.

A partir do Diagrama de Venn, foi possível observar que a suplementação dietária com LSEO estimulou o surgimento de um maior número de espécies singulares (50 OTUs) (dados não publicados), se compararmos com aquele encontrado para a MI dos peixes do grupo controle (7 OTUs). E, nesse sentido, parece que o óleo essencial utilizado no presente estudo inibiu o crescimento de algumas espécies: *Bosea thiooxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus pauculus*, *Leucobacter komagatae*, *Mesorhizobium loti*, *Nitrobacter vulgaris*, *Rhizobium mesosinicum*. Entre essas bactérias, algumas são potencialmente causadoras de doenças. A *B. thiooxidans* é gram-negativa, flagelada e, juntamente com as demais espécies do gênero, pode causar pneumonia, doenças intraoculares e bacteremia em seres humanos (Skipper et al., 2019); espécies do gênero *Burkholderia* têm sido associadas ao surgimento de doenças em peixes (Ramsey et al., 2001). A espécie *B. cepacia* é um bastonete gram-negativo ubíquo capaz de causar vermelhidão, hemorragia, secreção excessiva de muco na pele e nadadeiras, ulceração e eritema no tegumento, além de opacidade ocular em *Oreochromis niloticus* (Mahboub et al., 2022); e *C. pauculus* é um bacilo móvel não fermentativo, aeróbico, gram-negativo e não formador de esporos (Farang et al., 2020). Essa bactéria também foi associada como patogênica e encontrada no MI de carpas (*Labeo rohita*) (Tyagi et al., 2019).

Nesse sentido, o LSEO parece ter interagido com a membrana celular, cuja permeabilidade depende da hidrofobicidade dos solutos que estão a sua volta, da sua composição e do coeficiente de partição sobre a membrana da bactéria (Sikkema, Bont & Poolman, 1995; & Lambert et al., 2001).

Embora o óleo essencial utilizado no presente estudo tenha agido sobre algumas bactérias potencialmente prejudiciais à saúde animal, esse efeito parece não ter tido êxito sobre as cinco principais espécies (pertencentes a três gêneros) reportadas aqui, encontradas tanto na MI dos animais não suplementados, quanto naquela dos suplementados. Há que se ressaltar que o gênero *Aeromonas* têm grande importância médica e econômica e, apesar do potencial para causar sérios problemas na aquicultura de peixes de água doce (Trust, 1986), ele é comumente observado no intestino dos peixes, na água e no sedimento (Sugita et al., 1995). Bactérias pertencentes a esse gênero influenciam a digestão, a regulação enzimática e as respostas ao estresse (Robinson et al. 2018; Egerton et al. 2018; & Poletto et al., 2018); Espécies do gênero *Enterobacteraceae* estão amplamente distribuídas na natureza, são encontradas nos tecidos de peixes aparentemente saudáveis (Newaj et al., 2008), mas têm sido relatadas como oportunistas também, podendo causar diarreia nesses animais (Rajasekaran, 2008; & Shender et al., 2009);

Plesiomonas shigelloides são bactérias frequentemente encontradas em ambientes de água doce e estuarinos, das regiões tropical e subtropical e, por isso, animais encontrados nesses espaços são suscetíveis a abrigar essa espécie. Durante evento de mortalidade massiva de peixes, *P. shigelloides* foi isolada de *Ctenopharyngodon nidellus* (Hu et al., 2014) e de *Oreochromis niloticus* (Liu et al., 2015).

É provável que os peixes do presente estudo não tenham desenvolvido enfermidades em decorrência da presença dessas bactérias potencialmente patogênicas porque elas são naturalmente encontradas na MI. Além disso, o ambiente que abrigava os animais estava estável, com manejo adequado e manutenção dos parâmetros de qualidade da água. De acordo com Odum (1988), em um ecossistema balanceado, as bactérias e os animais podem viver em equilíbrio harmônico.

4.4 Enzimas de estresse oxidativo

O sistema antioxidante funciona como uma proteção contra danos oxidativos ocasionados por radicais livres na forma de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (Yousefi et al., 2022; Evans e Cooke, 2004). Por esse motivo, é tão importante proporcionar condições para que esse sistema funcione de forma adequada, impedindo e/ou reduzindo a formação de produtos biológicos prejudiciais à saúde dos animais.

No presente estudo, embora não tenha havido diferenças estatísticas significativas nos valores de GR entre os tratamentos, observou-se uma elevação da atividade da GPx e da CAT aparentemente dependente do aumento da concentração de LSEO. Essa informação, no entanto, deve ser considerada com cautela, na medida em que existiram variações no efeito do uso desse OE, tanto em relação às enzimas de estresse oxidativo analisadas, quanto em relação aos valores encontrados para cada uma delas entre os tratamentos administrados para os *D. rerio*.

De qualquer modo, os resultados observados neste trabalho concordam com os encontrados por Saccol et al. (2013), em que o *L. alba* EO foi suplementado na dieta de *Rhamdia quelen* juvenis por 60 dias. Esses autores observaram aumento da CAT no fígado (2.0 mL OE por kg de dieta) e no rim (0.25, 0.5 e 1.0 mL EO por kg de dieta), bem como da GPx no músculo dos animais (0.5, 1.0 e 2.0 mL OE por kg de dieta). No entanto, diferentemente do reportado por nós, Sönmez et al. (2015) verificaram redução da atividade das enzimas antioxidantes em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* alimentadas por dois meses com dieta suplementada com óleo de tomilho (*Thymus vulgaris*).

Embora a comparação entre esses resultados revele uma aparente dissonância em relação às atividades enzimáticas, há que se ressaltar que uma série de fatores pode estar agindo

sobre esse sistema, a exemplo da capacidade funcional de cada tecido, do tempo de suplementação dietária e da concentração dos compostos inseridos na dieta e até mesmo do macro e microambiente nos quais os animais estão inseridos.

Os OE possuem importante papel como fornecedores de constituintes naturais ativos, são uma opção relativamente econômica e ambientalmente sustentável e, por isso, têm sido utilizados na alimentação de diferentes espécies animais, inclusive na aquicultura (Yang et al., 2015; Aanyu et al., 2018). Em estudo conduzido com a utilização de folhas de *L. sidoides*, por exemplo, Garmus et al. (2015) concluíram que extratos contendo maior concentração de compostos fenólicos foram mais ativos e tiveram a melhor atividade antioxidante.

Nesse sentido, de maneira análoga ao sugerido por Zheng et al. (2009), é possível que a atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes na composição do LSEO do presente estudo, em especial dos constituintes majoritários timol (72,2 %) e *p-cimeno* (8,1 %), tenha um importante papel no alívio do estresse oxidativo observado a partir da análise das enzimas do fígado de *D. rerio*, principalmente naquelas do tratamento EO_{0,25%}, sugerindo um possível efeito tóxico das concentrações mais elevadas (EO_{1,00%} e EO_{1,25%}). Ressalta-se, todavia, que a oscilação da concentração das enzimas analisadas, entre os tratamentos utilizados, pode ter sido influenciada também pelo tempo de suplementação dietária empregado.

4.5 Parâmetros histológicos

Os órgãos analisados na histologia possuem importância fisiológica e na manutenção da homeostase dos peixes. O fígado, por exemplo, participa ativamente do processamento de carboidratos, proteínas, vitaminas e lipídios, além de promover a detoxificação de contaminantes (Lehmann et al., 2020); o rim desempenha as funções de filtragem do sangue e excreção de resíduos, bem como atua na osmorregulação (Davidson, 2014); e o baço é um órgão linfóide periférico, responsável por fornecer barreira de defesa para o organismo, por meio da produção de linfócitos e macrófagos, sendo por isso também considerado um dos principais órgãos do sistema imunológico, e atua na hematopoiese (David e Kartheek, 2015).

De modo geral, apesar de não existir um padrão de alterações bem nítido entre as lesões observadas nos peixes alimentados com diferentes concentrações do LSEO, a redução dos danos hepáticos e renais constatados nos animais suplementados com os menores teores (EO_{0,25%}, EO_{0,50%}) em relação àquelas observadas nos peixes dos demais grupos, provavelmente está relacionada ao baixo efeito tóxico dessas concentrações. De fato, os OE auxiliam na manutenção da saúde dos peixes, a exemplo do relatado por Dawood et al. (2020), em que

tilápias *Oreochromis niloticus* alimentadas com OE de mentol parecem ter sido beneficiadas em termos de alterações histológicas, provavelmente pela indução de respostas imunológicas e fisiológicas. Semelhante ao observado em nosso estudo, em que registramos progressão das perdas do aspecto cordonal e da integridade do pâncreas, bem como aumento de alterações nucleares precursoras à necrose (cariólise e cariorrexe), Yigit et al. (2017) relataram que em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com dieta contendo *Origanum onites* OE nas concentrações mais elevadas (1.5, 2.5 e 3 mL kg⁻¹ *O. onites*), foram observadas necrose ou degeneração, tanto no fígado quanto no rim.

Em termos de alterações histológicas do baço, destaca-se que, de modo geral, a suplementação dietária com LSEO foi positiva para a redução da necrose e da esteatose, principalmente nos grupos EO_{0,25%} e EO_{0,50%}, mas não observamos diferenças estatísticas significativas com relação ao controle, provavelmente em função do reduzido período em que os animais foram alimentados com o OE.

Embora o efeito do LSEO já tenha sido positivo, mesmo que de forma sutil, no fígado, rim e baço, foi no intestino que os maiores benefícios da suplementação dietária puderam ser notados. Nesse contexto, houve aumento do número de vilos, bem como de seus comprimento e largura, elevação da quantidade de células caliciformes e da área dos vilos principalmente dos animais suplementados com as menores concentrações do OE. A melhora nas características morfométricas intestinais pode estar relacionada ao desbalanço na microbiota, ou seja, ao favorecimento de bactérias benéficas em detrimento daquelas prejudiciais (que agredem a mucosa) (Viola e Vieira, 2007). Tal como sugerido por Robles et al. (2013), o LSEO pode ter fornecido energia para que as bactérias entéricas benéficas se multiplicassem no intestino dos *D. rerio* do presente estudo. As propriedades lipofílicas dos compostos dos OE conferem aos seus constituintes, principalmente aos majoritários, a capacidade de transpor a membrana das bactérias até atingir o meio intracelular. Isso faz com que ocorra aumento da diversidade da MI, com elevação do número de bactérias probióticas (Helander et al., 1998).

5. Conclusão

O LSEO à concentração de 0,25% na ração, administrado durante 15 dias, foi benéfico para os peixes *D. rerio* na medida em que alterou a MI, aumentando a riqueza, diversidade e abundância das espécies de bactérias. A suplementação dietária com o óleo essencial inibiu o crescimento de algumas espécies de bactérias potencialmente patogênicas. O LSEO foi capaz de aliviar o estresse oxidativo observado a partir da análise das enzimas do fígado de *D. rerio*,

bem como atuou na redução das alterações histológicas do fígado, rim e baço. Além disso, animais do grupo *L. sidoides* EO_{0,25%} apresentaram melhora nas características morfométricas intestinais, como aumento do número, comprimento e largura de vilos, bem como elevação da quantidade de células caliciformes e da área dos vilos, sugerindo influência sobre o balanço de bactérias entéricas. Outros estudos devem ser conduzidos a fim de avaliar o potencial probiótico das bactérias mais abundantes na MI de *D. rerio*.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem pelo suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de pesquisa para Maurício Laterça Martins (CNPq 306635/2018-6), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código de Financiamento 001).

Referências Bibliográficas

AANYU, Margaret; BETANCOR, Mónica B.; MONROIG, Oscar. Effects of dietary limonene and thymol on the growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 488, p. 217-226, 2018.

ABDEL-LATIF, Hany MR; KHALIL, Riad H. Evaluation of two phytobiotics, *Spirulina platensis* and *Origanum vulgare* extract on growth, serum antioxidant activities and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to pathogenic *Vibrio alginolyticus*. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 250, p. 250-255, 2014.

ADAMS, R.P.; SPARKMAN, O.D. Review of identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, 18, 803-806, 2007.

AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. In: **Methods in Enzymology**. Academic press, 1984. p. 121-126.

ARAÚJO MARCO, Cláudia et al. Chemical composition and allelopathic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. **Chilean Journal of Agricultural research**, v. 72, n. 1, p. 157-160, 2012.

BABICKI, Sasha et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W147-W153, 2016.

BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BENTO, M. H. L. et al. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals—Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 9, 2013.

BOTELHO, Marco A. et al. Nanotechnology in phytotherapy: antiinflammatory effect of a nanostructured thymol gel from *Lippia sidoides* in acute periodontitis in rats. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 1, p. 152-159, 2016.

BRAND, Michael; GRANATO, Michael; NÜSSLEIN-VOLHARD, Christiane. Keeping and raising zebrafish. **Zebrafish: a practical approach**, v. 1, p. 7-37, 2002.

BRUM, Aline et al. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 490, p. 98-107, 2018.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 1-2, p. 167-170, 2008.

CARDA-DIÉGUEZ, Miguel; MIRA, Alex; FOUZ, Belén. Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 87, n. 2, p. 451-459, 2014.

CARLBERG, Inger; MANNERVIK, Bengt. [59] Glutathione reductase. In: **Methods in Enzymology**. Academic press, 1985. p. 484-490.

CAVALCANTI, Eveline Solon Barreira et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 541-544, 2004.

CAVALCANTI, S. C. H. et al. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 829-832, 2010.

COGO, Antônio JD et al. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

COSTA, Sônia Maria O. et al. Chemical Constituents from *Lippia sidoides* and Cytotoxic Activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 6, p. 792-795, 2001.

COSTA, Sônia Maria O. et al. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 66-67, 2002.

DAIRIKI, J. K. et al. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. **Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2013.

DAMMSKI, Ana Paula et al. Zebrafish: manual de criação em biotério. **Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná**, p. 20-1, 2011.

DAVID, M.; KARTHEEK, R. M. Histopathological alterations in spleen of freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to sublethal concentration of sodium cyanide. **Open Veterinary Journal**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2015.

DAVIDSON, Alan J. Kidney regeneration in fish. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 126, n. 2, p. 45-49, 2014.

DAWOOD, Mahmoud AO et al. The impact of menthol essential oil against inflammation, immunosuppression, and histopathological alterations induced by chlorpyrifos in Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 102, p. 316-325, 2020.

DE ALENCAR-ARARIPE, Marcio Gomes et al. A clinical trial and oral wound treated by essential oil of *Lippia sidoides* mouthrinse in horses. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2014.

DE ALMEIDA ROCHA, Rodhes Geovana et al. Ação da *Lippia sidoides* Cham nas infecções de faringe, cavidade oral e problemas odontológicos: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e34911326537-e34911326537, 2022.

DE ARAÚJO BATISTA, Rayanne Sales; DE SOUZA SILVA, Géssica; FEITOSA, Suellen E. Atividade antifúngica de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre. **Revista AGROTEC-v**, v. 34, n. 1, p. 40-49, 2013.

DE LIMA, Glauber Pacelli Gomes et al. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton species* against *Aedes aegypti* L. **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 1953-1958, 2013.

DE OLIVEIRA HASHIMOTO, Gabriela Sayuri et al. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 450, p. 182-186, 2016.

DE VASCONCELOS SILVA, M. G. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.

DIDRY, N. P.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. **Die Pharmazie**, v. 48, n. 4, p. 301-304, 1993.

EGERTON, Sian et al. The gut microbiota of marine fish. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 873, 2018.

EVANS, Mark D.; COOKE, Marcus S. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. **Bioessays**, v. 26, n. 5, p. 533-542, 2004.

FARAG, Alaa M. et al. Microbiological profile of ventilator-associated pneumonia among intensive care unit patients in tertiary Egyptian hospitals. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 14, n. 02, p. 153-161, 2020.

FLOHÉ, Leopold; GÜNZLER, Wolfgang A. [12] Assays of glutathione peroxidase. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 1984. p. 114-120.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

GAMES, Ellen et al. Structurally related monoterpenes p-cymene, carvacrol and thymol isolated from essential oil from leaves of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) protect mice against elastase-induced emphysema. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1390, 2016.

GARMUS, Tábata T. et al. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 68-75, 2015.

GERTSCH, Jürg et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Il Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 387-389, 2001.

GÓMEZ, Geovanny D.; BALCÁZAR, José Luis. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 145-154, 2008.

GOVEN, Beverly A.; AMEND, Donald F. Mebendazole/trichlorfon combination: a new anthelmintic for removing monogenetic trematodes from fish. **Journal of Fish Biology**, v. 20, n. 4, p. 373-378, 1982.

GRACIA-VALENZUELA, M. H. et al. Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against *Vibrio* bacteria in shrimps. **Archives of Biological Sciences**, v. 66, n. 4, p. 1367-1370, 2014.

GRUSH, J.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, v. 1, n. 1, p. 46-53, 2004.

GUERRA-SANTOS, Bartira et al. Parâmetros hematológicos e alterações histopatológicas em bijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) com amyloodiniose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1184-1190, 2012.

GUIMARÃES, Luiz Gustavo de L. et al. General characteristics, phytochemistry and pharmacognosy of *Lippia sidoides*. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 11, p. 1934578X1501001116, 2015.

- GUIMARÃES, Luiz Gustavo de Lima et al. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 267-275, 2014.
- HAMMER, Øyvind et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.
- HASSAN, W.H.B. et al. The chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lavandula coronopifolia* growing in Saudi Arabia. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, 604-515, 2014.
- HE, Wangquan et al. Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 70, p. 164-173, 2017.
- HEBERLE, Henry et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2015.
- HELANDER, Ilkka M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.
- HENAO-MEJIA, Jorge et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 179-185, 2012.
- HINTON, D. E. et al. Histopathologic Biomarkers, In; Huggett, RJ, Kimerli, R. Mehrle, APM Jr., Bergman, HL (Ed.), **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. 1992.
- HINTON, DAVID E. Integrative histopathological effects of environmental stressor on fishes. In: **American Fisheries Society Symposium**. 1990. p. 51-66.
- HOWE, Kerstin et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.
- HU, Qiandong et al. Isolation and identification of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* from diseased grass carp. **Wei sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica**, v. 54, n. 2, p. 229-235, 2014.
- HUMASON, Gretchen L. et al. Animal tissue techniques. **Animal Tissue Techniques**., 1962.
- HUYBEN, David et al. Dietary microencapsulated blend of organic acids and plant essential oils affects intestinal morphology and microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2063, 2021.
- HYLDGAARD, Morten; MYGIND, Tina; MEYER, Rikke Louise. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 12, 2012.

JATOBÁ, Adolfo et al. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nylo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1201-1207, 2008.

KENT, Michael L. et al. Development and maintenance of a specific pathogen-free (SPF) zebrafish research facility for *Pseudoloma neurophilia*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 95, n. 1, p. 73-79, 2011.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LEE, Si Eun et al. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. **Life Sciences**, v. 73, n. 2, p. 167-179, 2003.

LEHMANN, Nicollas Breda et al. Parasitological and histopathological diagnosis of a non-native fish (*Oreochromis* sp.) with a noticeable presence in a natural Brazilian river environment. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 1, p. 201-212, 2020.

LI, Yuan et al. Intestinal microbiome-metabolome responses to essential oils in piglets. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1988, 2018.

LIMA, Rafaela Karin et al. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 664-671, 2011.

LIU, Zhigang et al. Identification and pathological observation of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* strain isolated from cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Wei sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica**, v. 55, n. 1, p. 96-106, 2015.

MA, Shuhui et al. Effects of tussah immunoreactive substances on growth, immunity, disease resistance against *Vibrio splendidus* and gut microbiota profile of *Apostichopus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 63, p. 471-479, 2017.

MAHBOUB, Heba H. et al. Dietary black cumin (*Nigella sativa*) improved hemato-biochemical, oxidative stress, gene expression, and immunological response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected by *Burkholderia cepacia*. **Aquaculture Reports**, v. 22, p. 100943, 2022.

MARCHESE, Anna et al. Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on p-cymene. **Materials**, v. 10, n. 8, p. 947, 2017.

MARTINS, M. L. et al. A method for collecting eggs of *Pseudocapillaria tomentosa* (Nematoda: Capillariidae) from zebrafish *Danio rerio* and efficacy of heat and chlorine for killing the nematode's eggs. **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 2, p. 169-182, 2017.

MATOS, FJ de A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham.: farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 79, n. 3, p. 84-87, 1998.

- MIRALDI, Elisabetta; GIACHETTI, Daniela; FERRI, Sara. Quality control of aromatic drugs reported in European Pharmacopoeia 3rd edition. **II Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 365-371, 2001.
- MIRALDI, Elisabetta; GIACHETTI, Daniela; FERRI, Sara. Quality control of aromatic drugs reported in European Pharmacopoeia 3rd edition. **II Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 365-371, 2001.
- MONTEIRO, Patricia Castro et al. Dietary supplementation with essential oils of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* on the growth and hemato-immunological parameters of *Colossoma macropomum* challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100561, 2021.
- MUSHTAQ, Mian Yahya; VERPOORTE, Robert; KIM, Hye Kyong. Zebrafish as a model for systems biology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 29, n. 2, p. 187-205, 2013.
- NAYAK, Sukanta K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. 1553-1573, 2010.
- NEWAJ-FYZUL, A. et al. Prevalence of bacterial pathogens and their anti-microbial resistance in tilapia and their pond water in Trinidad. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 4, p. 206-213, 2008.
- NOVOTNY, L. et al. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. **Veterinarni Medicina**, v. 49, n. 9, p. 343, 2004.
- ODUM, E. P. Ecologia. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan S. A.*, 434p. 1988.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.
- POLETTI, Tatiana Vieira et al. Isolation and Identification of a Potential Amylolytic Probiotic Bacterium from the Gut of Jundiá Catfish, *Rhamdia quelen*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.
- RAJASEKARAN, P. *Enterobacteriaceae* group of organisms in sewage-fed fishes. **Advanced Biotech**, v. 8, p. 12-14, 2008.
- RAJGOPAL, Arun et al. Immunomodulatory effects of *Lippia sidoides* extract: induction of IL-10 through cAMP and p38 MAPK-dependent mechanisms. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 3, p. 370-377, 2015.
- RAMSEY, Alan H. et al. *Burkholderia cepacia* lower respiratory tract infection associated with exposure to a respiratory therapist. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 22, n. 7, p. 423-426, 2001.
- RAN, Chao et al. Thymol and carvacrol affect hybrid tilapia through the combination of direct stimulation and an intestinal microbiota-mediated effect: insights from a germ-free zebrafish model. **The Journal of Nutrition**, v. 146, n. 5, p. 1132-1140, 2016.
- RIVERO-WENDT, Carla Letícia Gediél et al. Zebrafish: Recomendações de Manutenção em Laboratório. **UNICIÊNCIAS**, v. 24, n. 2, p. 141-145, 2020.

- ROBINSON, Catherine D. et al. Experimental bacterial adaptation to the zebrafish gut reveals a primary role for immigration. **PLoS Biology**, v. 16, n. 12, p. e2006893, 2018.
- ROBLES, R. et al. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1567-1580, 2013.
- SACCOL, Etiane MH et al. Addition of *Lippia alba* (Mill) NE Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416, p. 244-254, 2013.
- SALMINEN, Seppo J.; GUEIMONDE, Miguel; ISOLAURI, Erika. Probiotics that modify disease risk. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 5, p. 1294-1298, 2005.
- SANTOS, Monyele Acchile et al. Parasitic fauna and histopathology of farmed freshwater ornamental fish in Brazil. **Aquaculture**, v. 470, p. 103-109, 2017.
- SCHWAIGER, Julia et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.
- SEKIROV, Inna; FINLAY, B. Brett. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 17, p. 4159-4167, 2009.
- SHENDER, Lisa A.; GLOCK, Robert D.; SPRAKER, Terry R. Salmonellosis in a free-ranging population of javelinas (*Pecari tajacu*) in south central Arizona. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 4, p. 941-951, 2009.
- SIKKEMA, J. A. N.; DE BONT, Jan A.; POOLMAN, Bert. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.
- SILVA, Carla S. Rodrigues et al. Antibacterial effect of Brazilian brown propolis in different solvents against *staphylococcus* spp. isolated from caprine mastitis. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 247-251, 2012.
- SKIPPER, Caleb; FERRIERI, Patricia; CAVERT, Winston. Bacteremia and central line infection caused by *Bosea thiooxidans*. **IDCases**, v. 19, p. e00676, 2020.
- SOARES, Bruna Viana; TAVARES-DIAS, Marcos. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. 2013.
- SÖNMEZ, Adem Yavuz et al. Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 165-175, 2015.
- SOUZA, Carine de Freitas et al. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: a review. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 785, 2019.
- STEINER, T.; ENCARNACÃO, P. Latest trends in gut health management. **Kailua, Hawaii: Aquafeed Advances in Processing & Formulation**, p. 9-10, 2010.

- SUGITA, Haruo et al. Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 4128-4130, 1995.
- TAVARES-DIAS, Marcos. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. **Aquatic Living Resources**, v. 31, p. 13, 2018.
- TRUST, T. J. Pathogenesis of infectious diseases of fish. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 479-502, 1986.
- TYAGI, Anuj et al. Shotgun metagenomics offers novel insights into taxonomic compositions, metabolic pathways and antibiotic resistance genes in fish gut microbiome. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 3, p. 295-303, 2019.
- VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, Daniel et al. Control of *Staphylococcus aureus* biofilms by the application of single and combined treatments based in plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 286, p. 128-138, 2018.
- VIOLA, Eduardo Spillari; VIEIRA, Sergio Luiz. Supplementation of organic and inorganic acidifiers in diets for broiler chickens: performance and intestinal morphology. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1097-1104, 2007.
- WANG, An R. et al. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 3, p. 626-640, 2018.
- XU, J. et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174-179, 2008.
- YANG, Chengbo et al. Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application. **Pathogens**, v. 4, n. 1, p. 137-156, 2015.
- YANG, Dongyang; XU, Wei. Clustering on Human Microbiome Sequencing Data: A Distance-Based Unsupervised Learning Model. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1612, 2020.
- YANG, Tsung-Shi; CHAO, Louis Kuo-Ping; LIU, Tai-Ti. Antimicrobial activity of the essential oil of *Glossogyne tenuifolia* against selected pathogens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 14, p. 2965-2971, 2014.
- YIGIT, Nalan Ozgur et al. Effect on histology and nutrient digestibility of supplemented *Origanum onites* essential oil to rainbow trout diets (*Oncorhynchus mykiss*). **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 51, n. 3, 2017.
- YOUSEFI, Morteza et al. Effects of dietary thyme essential oil and prebiotic administration on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) welfare and performance. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 120, p. 737-744, 2022.
- ZHANG, R. et al. Dietary oregano essential oil improved the immune response, activity of digestive enzymes, and intestinal microbiota of the koi carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 518, p. 734781, 2020.
- ZHENG, Z. L. et al. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, n. 3-4, p. 214-218, 2009.

CAPÍTULO II

Óleo essencial de *Lippia sidoides* (Verbenaceae) melhora a resposta inflamatória e a condição histológica em *Danio rerio*

Lucas Cardoso^{*a}, Francisco Célio Maia Chaves^b, William Eduardo Furtado^c, Luciana Aparecida Honorato^d, Jonathan Paulo Agnes^d, Daniela Coelho dos Santos^e, Rozangela Curi Pedrosa^e, Marília Tedesco^a, Silvia Terra Fontes^a e Maurício Laterça Martins^a

^a AQUOS – Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

^b EMBRAPA Amazonia Ocidental, Rod. AM 010, km 29, Zona Rural, 69010-970 Manaus, AM, Brasil.

^c Departamento de Doenças Infecciosas e Saúde Pública, Jockey Club Faculdade de Medicina Veterinária e Ciências da Vida, Universidade da Cidade de Hong Kong, Hong Kong, China.

^d Departamento de Farmacologia, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Av. Prof. Henrique da Silva Fontes 321, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

^e Laboratório de Bioquímica Experimental, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Av. Prof. Henrique da Silva Fontes 321, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

* Autor correspondente: Lucas Cardoso. E-mail: lucaqi@gmail.com. AQUOS — Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil. Phone: (+55) 48 996035372.

Artigo redigido conforme as normas do periódico “Fish and Shellfish Immunology” (ISSN: 1050-4648).

Resumo

Este estudo avaliou o efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* (LSEO), à concentração de 0.25 %, sobre a resposta inflamatória e os parâmetros histológicos em *Danio rerio*. Um total de 315 peixes foi distribuído em 21 aquários (n = 15), perfazendo os seguintes grupos: NC – animais alimentados com ração sem suplementação; GA – animais alimentados com ração contendo álcool de cereais; e EO – animais alimentados com ração contendo LSEO. Após um período de 15 dias, os animais foram anestesiados e o processo inflamatório induzido por injeção via intraperitoneal (VI) como segue: parte dos peixes não recebeu injeção VI (NC); parte deles recebeu injeção VI contendo solução salina 0.65 % (SS ou S) (NC_S, GA_S e EO_S) e outra parte recebeu injeção VI com Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE ou T) (NC_T, GA_T e EO_T). Depois de 6 h, os *D. rerio* foram novamente anestesiados e eutanasiados para coleta do exsudato e dos órgãos para análise histológica. Embora EO_T tenha apresentado maiores valores de monócitos e basófilos do que aqueles reportados para NC, sugerindo um possível efeito do fitoterápico sobre os mecanismos de defesa dos peixes, em geral, não houve diferenças estatísticas significativas quanto à contagem total e diferencial de leucócitos entre os grupos suplementados e os demais. Em relação à análise histológica, fígado, rim, baço e intestino dos animais do tratamento EO_T apresentaram reduzidas alterações em relação àquelas observadas para os órgãos dos animais dos outros tratamentos, observando-se, por exemplo, manutenção do aspecto cordonal, menor degeneração tubular, e maior número, comprimento, área e perímetro de vilos intestinais. Portanto, a utilização de LSEO à concentração de 0.25 % parece ser benéfica à saúde de *D. rerio* submetidos à injeção VI com CAE, na medida em que o fitoterápico atuou sobre as células de defesa e promoveu a melhoria das condições histológicas. Este estudo permite o aumento de conhecimentos relacionados à utilização de EO na dieta para peixes, em especial para o *D. rerio*, espécie comumente utilizada como modelo biológico nas atividades de pesquisa.

Palavras-chave: aquicultura, ascite, histomorfometria, suplementação dietária.

1. Introdução

A necessidade de identificar novos agentes, economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis, que atuem sobre a melhoria da saúde humana e animal, tem levado ao estudo de compostos derivados do metabolismo secundário de espécies vegetais (Shoff et al., 1991). Nesse ínterim, o óleo essencial de *Lippia sidoides* (LSEO), espécie nativa da rica flora brasileira, tem despontado na medicina popular em função de suas propriedades antibacteriana, antioxidante, antisséptica, antifúngica e anti-inflamatória (Fernandes et al., 2008; Almeida et al., 2010). Por esse motivo, ela também foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) do Brasil (Garmus et al., 2015).

No caso do LSEO, sua atuação antioxidante está intrinsecamente relacionada aos seus constituintes majoritários, tais quais o monoterpeno timol. Segundo Santos et al. (2016), a atividade de fitoquímicos como os terpenoides é responsável pelo seu potencial antitumoral e,

nesse sentido, tem capacidade de atuar sobre células tumorais do Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE), um modelo comumente empregado para o estudo de neoplasia experimental.

De acordo com Ozaslan et al. (2011) e Salgado et al. (2002), a utilização do CAE é amplamente difundida porque se trata de um carcinoma indiferenciado, originalmente hiperdiploide, altamente transplantável, não apresenta regressão, possui rápida proliferação, tem vida útil curta, é totalmente maligno e não possui antígeno específico de transplante de tumor.

Os pressupostos que devem ser atendidos para que um animal seja considerado um modelo biológico, segundo Fagundes e Taha (2004), são: o estudo dos fenômenos biológicos ou de comportamento do animal sejam permitidos, um processo patológico espontâneo ou induzido possa ser investigado e o fenômeno, em um ou mais aspectos, seja semelhante ao fenômeno em seres humanos.

Nesse contexto, a produção de embriões transparentes e seu desenvolvimento fora do útero, a conformação das características fisiológicas, que permitem seu uso em diferentes áreas de pesquisa, e a inovação e o desenvolvimento de técnicas moleculares fazem do *Danio rerio* uma das espécies mais utilizadas como modelo biológico ao redor do mundo (Teame et al., 2019). Outros atributos também foram fundamentais para que isso acontecesse: a facilidade de manutenção nos aquários, a alta taxa reprodutiva, o ciclo curto de vida e a similaridade do seu material genético com a do genoma humano (Howe et al., 2013).

Com base nas propriedades do LSEO, nosso objetivo foi avaliar seus efeitos sobre o processo inflamatório e sobre as condições histológicas de *D. rerio* injetados com CAE.

2. Material e métodos

2.1 Extração do óleo essencial e análise de composição química

Folhas de *Lippia sidoides* cultivadas na Seção de Plantas Medicinais da EMBRAPA Amazônia Ocidental em Manaus, Amazonas (03° 06'23.04" S e 60° 01'35.14" W), com 50 m de altitude média e 2200 mm de precipitação anual média, foram utilizadas como matéria-prima para obtenção do óleo essencial (EO). As plantas foram coletadas no período da manhã, e o material processado no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Brasil. A hidrodestilação foi o método utilizado para a obtenção do EO, com auxílio de equipamento tipo Clevenger. Posteriormente, o óleo foi submetido à refrigeração a -18 °C em vidro âmbar.

Para análise da composição química, foi utilizado um cromatógrafo gasoso Agilent (Palo Alto, USA) 7890A equipado com coluna capilar HP-5 (5% -difênil-95% -dimetil silício 30 m × 0,32 mm x 0,25 µm). Programou-se a temperatura para a faixa de 60 a 240 °C, a 3 °C min⁻¹, e utilizou-se como gás de arraste o hidrogênio (1,5 mL min⁻¹). Injetou-se o volume total de 1,0 µL de solução de EO a 1% em diclorometano (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) com divisão de fluxo (1: 100, injetor a 250 °C). O espectro de massa foi obtido em um sistema Agilent 5973 N operado no modo de impacto eletrônico (EIMS) a 70 eV, acoplado a um cromatógrafo Agilent 6890 usando o mesmo procedimento de injeção e temperatura citados acima. O cálculo dos índices de retenção foi realizado a partir dos tempos de retenção dos compostos de uma série de n-alcenos (C7-C26). A identificação e quantificação dos compostos majoritários foram realizadas por comparação do espectro de massa obtido com os dados da biblioteca espectral (Wiley 6th Ed.) e pelos índices de retenção calculados e comparados com os valores publicados (Adams, 2007).

A espécie foi depositada no Herbário EAFM (Herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - CMZL) sob o número 13.882: nome científico: *Lippia sidoides*; nome comum: alecrim-pimenta; família: Verbenaceae.

2.2 Preparo da dieta experimental

Para o preparo das dietas experimentais, foi utilizada a ração comercial extrusada Nutripiscis Starter 45 da Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda. 0,8 mm. A inclusão do LSEO foi realizada de acordo com Dairiki et al. (2013), utilizando-se álcool de cereais como veículo para incorporação do óleo na ração. Assim, uma solução 100 mL de álcool de cereais com o LSEO diluído até a obtenção da concentração de 0.25% foi aspergido em 1000 g de ração; no tratamento álcool de cereais (GA), houve aspersion somente do álcool de cereais sobre a ração na mesma proporção. O controle negativo (NC) consistiu somente da ração comercial, sem suplementação dietária. A ração foi mantida à temperatura ambiente por 24 h para secagem e posteriormente armazenada a -18 °C. Vinte e quatro horas antes de fornecimento aos peixes, a ração era pesada e armazenada a 4 °C até o momento da alimentação. A oferta alimentar ocorreu por 15 dias, três vezes ao dia e com quantidade correspondente a 5 % da biomassa total do aquário.

2.3 Obtenção dos animais e condições experimentais

Os *D. rerio* adquiridos de uma piscicultura comercial em Araquari, Santa Catarina, foram transportados até o Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde os experimentos foram conduzidos. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC 8442200220).

O manejo dos peixes e a manutenção dos parâmetros de qualidade da água levaram em consideração as recomendações da comissão de ética e do manual intitulado “Zebrafish – Manual de criação em biotério” (Dammski et al., 2011). Nesse sentido, aquários plásticos retangulares de 16 L de volume útil foram utilizados como unidades experimentais, dispostas no Bioensaio de Peixes Ornamentais do Laboratório AQUOS/UFSC.

As unidades experimentais foram acopladas a um sistema de recirculação de água do tipo semi-aberto, com filtros mecânicos, biológicos (anaeróbio e aeróbio) e esterilização ultravioleta; a água foi desclorada com tiosulfato de sódio (5 mL de uma solução (50 g de tiosulfato de sódio diluído em 500 mL de água destilada) foram aplicados em 250 L de água do sistema); a taxa de renovação da água foi de aproximadamente 20 % ao dia e o excesso de fezes removido por sifonagem duas vezes ao dia; o fotoperíodo foi controlado 12L:12E (luz e escuro); em relação aos parâmetros de qualidade de água, temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram medidos diariamente com auxílio de multiparâmetro (Hanna[®], modelo HI-9828, USA); amônia total, nitrito e nitrato foram medidos todos os dias por teste colorimétrico (Alfakit[®], Brasil). Durante o período experimental, a temperatura média foi de $26,90 \pm 2,30$ °C, oxigênio dissolvido $7,33 \pm 1,00$ mg.L⁻¹, pH $6,62 \pm 0,21$, amônia total $0,03 \pm 0,01$ mg.L⁻¹, nitrito $0,01 \pm 0,01$ mg.L⁻¹, nitrato $0,00 \pm 0,00$ mg.L⁻¹.

2.4 Delineamento experimental

Um total de 315 peixes (peso de $0,3 \pm 0,04$ g e comprimento de $2,7 \pm 0,23$ cm) foi distribuído em 21 aquários (n = 15), perfazendo os seguintes grupos: NC – animais alimentados com ração sem suplementação; GA – animais alimentados com ração contendo álcool de cereais; e EO – animais alimentados com ração contendo LSEO. Após um período de 15 dias, os animais foram anestesiados (Grush & Noakes, 2004) o processo inflamatório foi induzido (seção 2.5) por injeção via intraperitoneal (VI) como segue: parte dos peixes não recebeu injeção VI (NC); parte deles recebeu injeção VI contendo solução salina 0.65 % (SS) (NC_S,

GA_S e EO_S) e outra parte recebeu injeção VI contendo CAE (NC_T, GA_T e EO_T), todos os tratamentos em triplicata.

2.5 Indução do processo inflamatório

Aproximadamente 4 mL de líquido ascítico foram coletados de três camundongos Balb/c previamente submetidos à injeção VI com CAE no Laboratório de Farmacologia, da UFSC. Do conteúdo total, armazenado em dois eppendorf estéreis de 2.5 mL cada, dispostos em uma caixa de isopor com gelo, uma alíquota de 10 µL foi diluída em 890 µL de solução salina 0.9 % contendo 100 µL de corante azul de tripan para o cálculo da viabilidade celular (Ri, 1999).

Imediatamente após esse procedimento, a fim de induzir o processo inflamatório, com auxílio de uma microseringa 26S Hamilton 80300 701N de 10 µL, procedeu-se à injeção VI do CAE em parte dos *D. rerio* previamente anestesiados (60 µL de solução estoque de óleo de cravo (10 %, diluída em etanol) por 1 mL de água (Grush & Noakes, 2004)), de modo que cada indivíduo alvo recebeu 10 µL do líquido ascítico contendo CAE à concentração de 10⁶ células tumorais viáveis (modificado de Moore et al., 2016). Dependendo do tratamento, conforme o delineamento experimental, parte dos animais teve o processo inflamatório induzido por injeção VI com solução salina 0.65 % (modificado de Martins et al., 2001; Martins et al., 2006; e Dotta, 2015).

2.6 Coleta e avaliação das células do exsudato

A resposta inflamatória foi avaliada 6 h após a injeção VI com SS ou CAE, de acordo com a metodologia modificada a partir de Martins et al. (2001). Nesse sentido, os peixes foram anestesiados (Grush & Noakes, 2004) e eutanasiados para coleta de material biológico e realização das análises propostas. Com auxílio de uma seringa de insulina 1 mL, o interior da cavidade intraperitoneal dos peixes foi lavado com 0.5 mL de PBS contendo 0.01 mL de EDTA a 5%. O conteúdo coletado foi armazenado em eppendorf estéril de 1.5 mL, mantido em gelo, e diluído à proporção 1:4 para determinar o número total de leucócitos (n.mL⁻¹) em Câmara de Neubauer. Posteriormente, o conteúdo foi centrifugado (150 G por 10 min), o sobrenadante descartado e as células utilizadas para confecção de extensões, coradas com Giemsa.

2.7 Análise histológica

Fígado, rim, baço e intestino de 84 peixes (4 por aquário) foram coletados e fixados em solução de formalina 10 % tamponada para avaliar as alterações provocadas pelos tratamentos administrados. Os órgãos foram desidratados em série crescente de álcool etílico, clarificados em xilol, embebidos em parafina aquecida a 60 °C e seccionados à espessura de 4 µm (Humason, 1962). As lâminas permanentes foram montadas em Entellan[®] e analisadas em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (ZEISS, Axio Imager A.2, Gottingen, Alemanha). As alterações histológicas foram avaliadas semiquantitativamente conforme o grau de severidade das lesões: 0 (ausência de alteração), 1 (alteração leve, correspondendo a menos de 25 % da área tecidual), 2 (alteração moderada, com 25 a 50 % da área tecidual) e 3 (alteração severa, com mais de 50% da área tecidual), de acordo com método descrito por Schwaiger et al. (1997) e modificado por Brum et al. (2018). Ademais, foi realizada a histomorfometria intestinal, isto é, foram medidos comprimento, largura, área e perímetro dos vilos, bem como quantificado o número de células caliciformes por vilos, utilizando, para tanto, fotomicrografias obtidas em DIC equipado com sistema de captura de imagem e software Zen Pro (Zeiss, Alemanha).

2.8 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para verificar normalidade e homocedasticidade de variância, respectivamente. Os dados não homogêneos foram transformados em $\log_{10}(x + 1)$. Estando os pressupostos garantidos, os dados foram submetidos à análise de variância anova unifatorial e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Todos os testes foram realizados ao nível significância de 5% com auxílio do *software* Statistica 10.0.

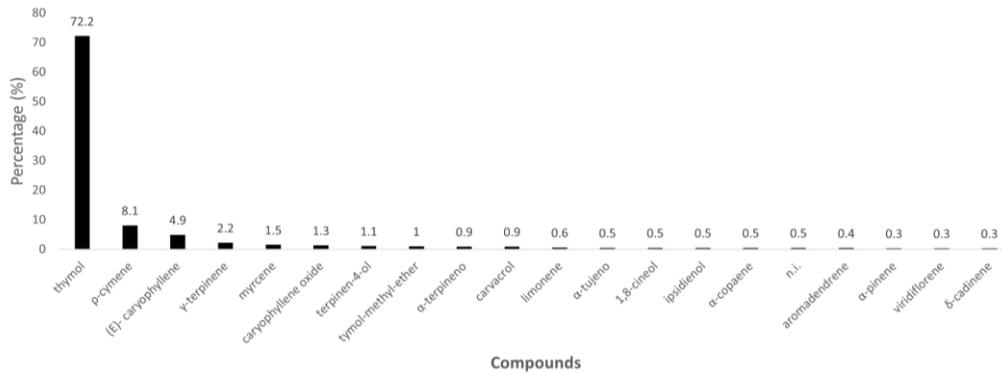
3. Resultados

3.1 Análise da composição do óleo essencial

Timol (72,2 %), *p*-cimeno (8,1 %) e (E)-cariofileno (4,9 %) figuraram como os compostos predominantes no LSEO (Figura 1). Em menor concentração, destacam-se: α -humuleno e espatulenol (0,2 %, cada); β -pineno, α -felandremo, δ -3-careno, (Z)- β -ocimeno, (E)-

β -ocimeno, terpinoleno, linalol, α -terpineol, n.i., allo-aromadendreno e α -muuroleno (0,1 %, cada).

Figura 1: composição do óleo essencial de *Lippia sidoides*; n.i = compostos não identificados.



3.2 Análise do exsudato

A partir da análise do exsudato, foi possível observar o seguinte (Tabela 1): em termos de leucócitos totais, verificou-se que NC_T e GA_T apresentaram maiores valores do que os reportados para NC e EO_S , porém EO_T não diferiu estatisticamente de nenhum dos demais tratamentos; a respeito dos linfócitos, GA_T exibiu aumento em comparação com NC, NC_S e EO_S , e EO_T apresentou valores estatisticamente iguais aos demais grupos; os monócitos foram mais elevados em EO_T do que em NC; basófilos foram maiores em EO_T e NC_S do que em NC; e os valores de neutrófilos foram mais elevados em GA_T do que em EO_T , GA_S e NC. Para esse tipo celular, os valores reportados para EO_T foram estatisticamente iguais a todos os tratamentos, exceto GA_T , o qual foi mais elevado.

Tabela 1: Exsudato da cavidade intraperitoneal de *Danio rerio*. Óleo essencial de *Lippia sidoides* (EO), controle negativo (NC), dieta suplementada somente com álcool de cereais (GA), injeção com solução salina 0.65 % (s) e injeção com Carcinoma Ascítico de Ehrlich (τ). Os dados são apresentados em média ± desvio padrão do número de células por microlitros ($n^{\circ} \mu\text{L}^{-1}$). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais pelo teste de Tukey test ($p < 0.05$).

Tratamento	Exsudato da cavidade intraperitoneal ($n^{\circ} \mu\text{L}^{-1}$)						
	Leucócitos totais	Linfócitos	Monócitos	Basófilos	Neutrófilos	Eosinófilos	Trombócitos
NC	94.95±45.74 ^b	81.68±36.27 ^c	10.35±9.38 ^b	1.58±3.68 ^b	1.13±3.56 ^b	0.23±0.71	2.03±1.97
NC _T	485.70±267.20 ^a	447.90±252.58 ^{ab}	26.10±20.86 ^{ab}	8.70±10.38 ^{ab}	3.00±3.87 ^{ab}	0.00±0.00	2.10±2.16
NC _S	213.00±101.97 ^{ab}	134.25±94.10 ^c	60.30±43.49 ^{ab}	14.85±15.11 ^a	3.60±4.72 ^{ab}	0.00±0.00	1.35±1.42
GA _T	398.10±126.53 ^a	336.60±135.34 ^a	46.05±30.15 ^{ab}	8.25±7.54 ^{ab}	6.90±6.45 ^a	0.30±0.79	2.85±2.16
GA _S	136.95±34.81 ^{ab}	102.30±32.13 ^{bc}	30.00±16.44 ^{ab}	3.60±3.97 ^{ab}	1.05±2.39 ^b	0.00±0.00	2.25±1.47
EO _T	245.85±78.19 ^{ab}	154.20±74.64 ^{abc}	80.25±53.10 ^a	9.90±6.79 ^a	1.50±3.26 ^b	0.00±0.00	4.50±4.42
EO _S	133.05±52.99 ^b	100.05±43.95 ^c	24.15±18.85 ^{ab}	7.35±6.67 ^{ab}	1.35±2.05 ^{ab}	0.15±0.58	2.10±1.34
P value	0.001	0.000	0.022	0.014	0.007	0.320	0.094

3.3 Análise histológica

A partir da análise histológica, foi possível observar os seguintes resultados em relação ao fígado dos animais (Figura 2 e Tabela 2): EO_T apresentou menor perda do aspecto cordonal do que o reportado para GA_T, GA_S e NC_S; em EO_T e EO_S houve redução da perda da uniformidade no tamanho das células e núcleos em comparação com GA_T, GA_S e NC_S; registrou-se diminuição do aspecto balonoso dos hepatócitos em EO_T, se comparado com NC_S; nos animais dos tratamentos EO_T, NC_S, GA_S e GA_T observou-se menor dilatação dos sinusoides do que em NC_T; em EO_T, houve redução do infiltrado eosinofílico em relação ao GA_S, menor hipertrofia dos hepatócitos, quando comparado aos GA_T, GA_S e NC_S e menos necrose do que em NC_T e GA_T.

Figura 2: Alterações histológicas do fígado de *Danio rerio* alimentados com *Lippia sidoides* EO. Em “a”, observam-se núcleos dos hepatócitos (cabeça de seta) e sinusoides normais (seta), além da manutenção do aspecto cordonal (EO_T); em “b” se evidencia a perda do aspecto cordonal e macroesteatose (asterisco) (NC_S); em “c”, as cabeças de seta mostram a congestão de grandes vasos, as setas pontuam um sinusoide congesto e dilatado e os asteriscos apontam necrose (NC_T); em “d”, tem-se a presença de muitos núcleos com cariorrexe (seta) e cariólise (cabeça de seta) (GA_T).

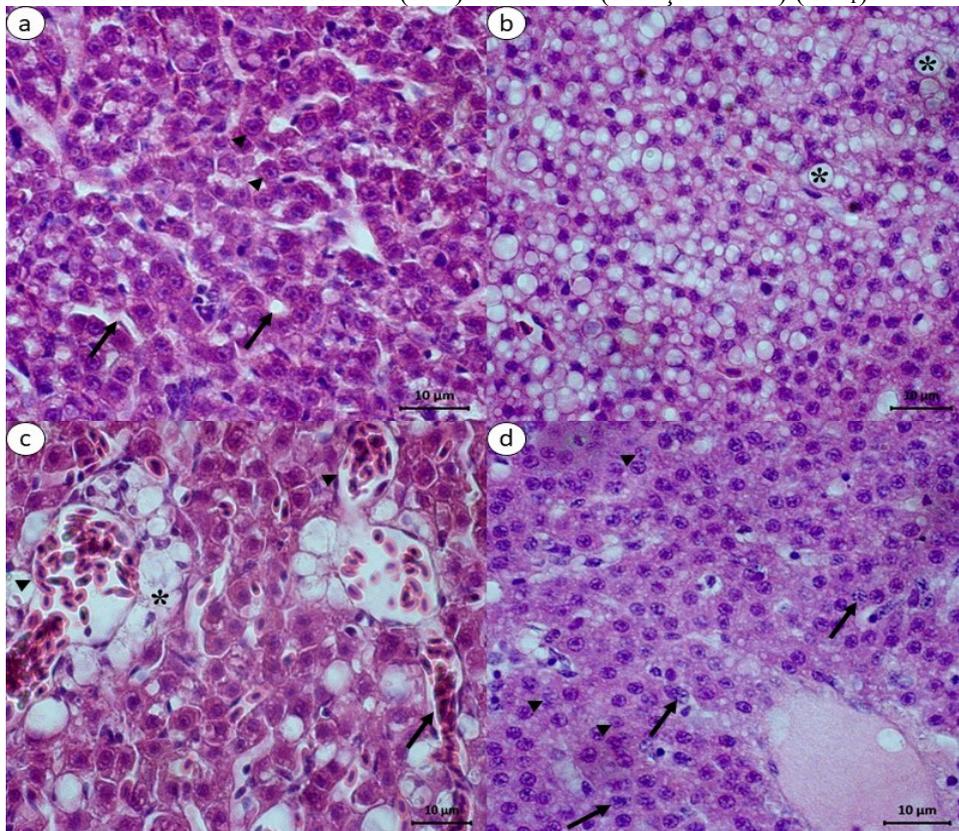


Tabela 2: Alterações histológicas do fígado de *Danio rerio*. Óleo essencial de *Lippia sidoides* (EO), controle negativo (NC), dieta suplementada somente com álcool de cereais (GA), injeção com solução salina 0.65 % (s) e injeção com Carcinoma Ascítico de Ehrlich (τ). Dados apresentados como média e desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais pelo Teste de Tukey (p <0.05).

Alteração histológica	NCs	NCτ	GAs	GAr	EOs	EOτ	P value
Perda do aspecto cordonal	72.92±7.22 ^a	66.67±16.28 ^{abc}	75.00±0.00 ^a	68.75±11.31 ^a	52.08±19.82 ^{bc}	50.00±21.32 ^c	0.000
Perda da uniformidade no tamanho das células e núcleos	60.42±22.51 ^a	50.00±26.11 ^{ab}	60.42±16.71 ^a	58.33±22.19 ^a	37.50±27.18 ^b	33.33±22.19 ^b	0.011
Perda da integridade do pâncreas	47.92±7.22 ^{ab}	50.00±0.00 ^a	50.00±0.00 ^a	50.00±0.00 ^a	39.58±12.87 ^b	43.75±11.31 ^{ab}	0.004
Presença de dutos biliares	0.50±0.52	0.92±0.29	0.58±0.51	0.42±0.51	0.67±0.49	0.50±0.52	0.165
Aspecto balonoso	62.50±19.94 ^a	50.00±26.11 ^{ab}	54.17±23.44 ^{ab}	58.33±22.19 ^{ab}	35.42±36.08 ^{ab}	31.25±24.13 ^b	0.021
Congestão de grandes vasos	35.42±29.11 ^a	39.58±24.91 ^a	25.00±18.46 ^{ab}	14.58±16.71 ^b	14.58±12.87 ^b	27.08±24.91 ^{ab}	0.029
Congestão do pâncreas	33.33±19.46	35.42±12.87	27.08±7.22	18.75±15.54	25.00±0.00	29.17±17.94	0.061
Congestão dos sinusoides	25.00±0.00	25.00±0.00	25.00±0.00	16.67±12.31	22.92±7.22	27.08±16.71	0.092
Deslocamento do núcleo dos hepatócitos	52.08±29.11 ^{ab}	45.83±25.75 ^{ab}	58.33±16.28 ^a	56.25±26.38 ^{ab}	27.08±27.09 ^b	39.58±27.09 ^{ab}	0.037
Dilatação dos sinusoides	8.33±12.31 ^b	22.92±12.87 ^a	2.08±7.22 ^b	0.00±0.00 ^b	12.50±13.06 ^{ab}	8.33±12.31 ^b	0.000
Infiltrado eosinofílico	2.08±7.22 ^{ab}	2.08±7.22 ^{ab}	12.50±13.06 ^a	4.17±9.73 ^{ab}	4.17±9.73 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	0.018
Infiltrado linfocitário	16.67±16.28	14.58±12.87	12.50±13.06	10.42±12.87	6.25±11.31	4.17±9.73	0.148
Hipertrofia dos hepatócitos	58.33±22.19 ^a	52.08±24.91 ^{ab}	56.25±15.54 ^a	52.08±32.78 ^a	37.50±34.54 ^{ab}	29.17±20.87 ^b	0.047
Hipertrofia do núcleo dos hepatócitos	25.00±0.00 ^{ab}	27.08±7.22 ^a	25.00±0.00 ^{ab}	20.83±9.73 ^{ab}	16.67±12.31 ^b	18.75±11.31 ^{ab}	0.022
Macrosteatose	50.00±28.20 ^a	29.17±14.43 ^{ab}	8.33±12.31 ^{bc}	0.00±0.00 ^c	14.58±19.82 ^{bc}	18.75±28.45 ^{bc}	0.000
Microsteatose	60.42±29.11	54.17±20.87	50.00±21.32	62.50±16.85	41.67±19.46	50.00±18.46	0.190
Necrose	47.92±12.87 ^{ab}	54.17±25.75 ^a	43.75±15.54 ^{ab}	54.17±20.87 ^a	35.42±29.11 ^{ab}	25.00±10.66 ^b	0.004
Núcleo com picnose	25.00±0.00	27.08±7.22	29.17±9.73	27.08±7.22	25.00±0.00	27.08±7.22	0.621
Núcleo com cariólise	25.00±0.00 ^c	37.50±13.06 ^{ab}	27.08±7.22 ^{bc}	39.58±12.87 ^a	29.17±9.73 ^{abc}	27.08±7.22 ^{bc}	0.001
Núcleo com cariorrexe	44.08±66.11	37.50±13.06	27.08±7.22	39.58±12.87	29.17±9.73	27.08±7.22	0.571

No rim (Figura 3 e Tabela 3), observou-se redução da degeneração granular em EO_T, em comparação com NC_T; houve menor hipertrofia celular em EO_T, EO_S e GA_S, em relação ao NC_T; em EO_T, registrou-se menos hipertrofia nuclear do que no NC_T e menor dilatação da luz tubular do que em NC_T e GA_T; observou-se mais rompimento celular em NC_T e GA_T do que em EO_T, EO_S e GA_S; em EO_T e GA_S, foram registrados menores valores de degeneração tubular do que em NC_S e NC_T; em EO_T, EO_S e NC_S, houve menos infiltrado linfocitário do que em NC_T.

Figura 3: Alterações histológicas do rim de *Danio rerio* alimentados com *Lippia sidoides* EO. Em “a”, observa-se a presença de túbulos renais íntegros (cabeça de seta) e glomérulo normal (seta) (EO_T); os asteriscos em “b” evidenciam intensa degeneração granular (NC_T); em “c”, há forte degeneração e rompimento celular (seta) e vacuolização celular (cabeça de seta) (NC_T); em “d”, tem-se intenso infiltrado linfocitário (seta) (NC_T).

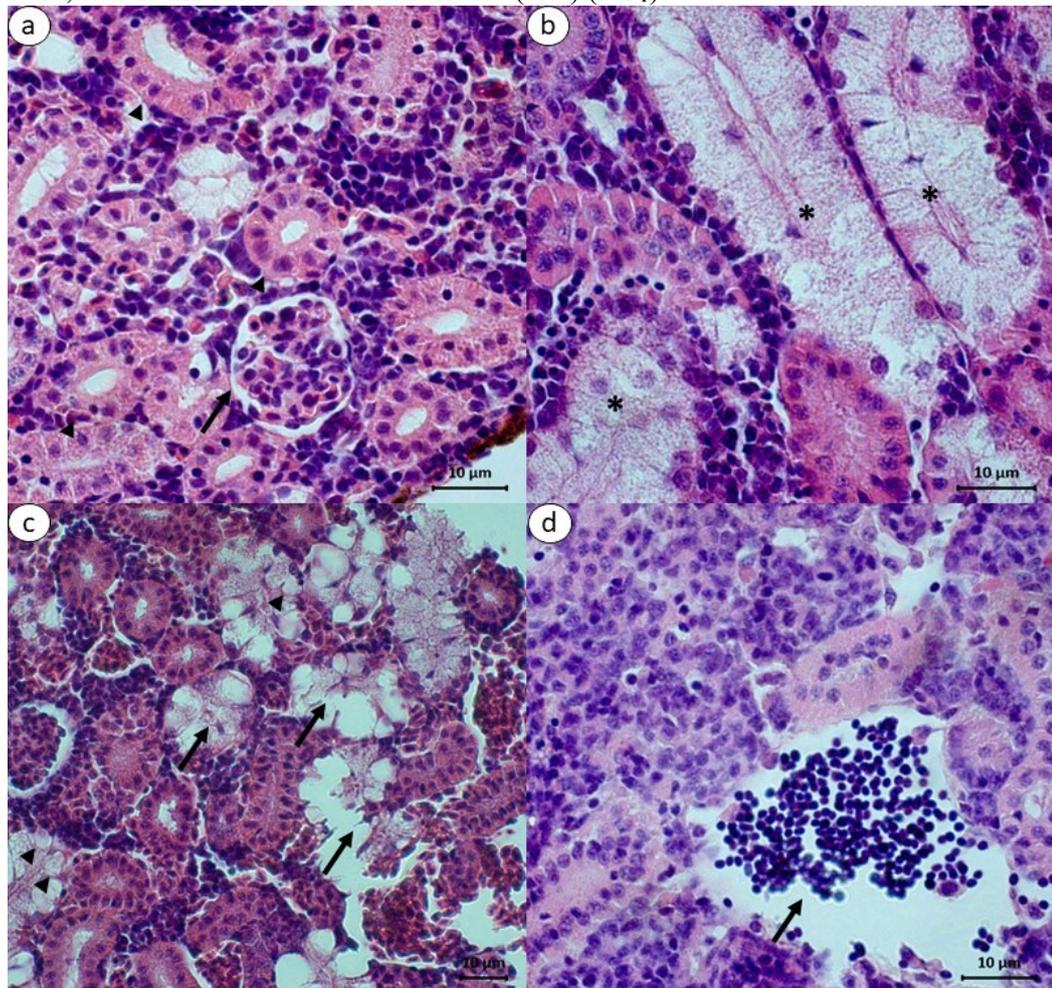


Tabela 3: Alterações histológicas do rim de *Danio rerio*. Óleo essencial de *Lippia sidoides* (EO), controle negativo (NC), dieta suplementada somente com álcool de cereais (GA), injeção com solução salina 0.65 % (s) e injeção com Carcinoma Ascítico de Ehrlich (r). Dados apresentados como média e desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$).

Alteração histológica	NCs	NCt	GAs	GAr	EOs	EOt	p value
Degeneração granular	66.67±16.23 ^{ab}	68.75±15.54 ^a	56.25±21.65 ^{ab}	64.58±12.87 ^{ab}	56.25±18.84 ^{ab}	45.83±23.44 ^b	0.033
Hipertrofia celular	52.08±16.71 ^{ab}	66.67±16.28 ^a	45.83±14.43 ^b	54.17±9.73 ^{ab}	41.67±12.31 ^b	37.50±19.94 ^b	0.000
Hipertrofia nuclear	35.42±12.87 ^{bc}	56.25±18.84 ^a	45.83±9.73 ^{ab}	47.92±7.22 ^{ab}	39.58±12.87 ^{bc}	29.17±14.43 ^c	0.000
Vacuolização celular	6.25±15.54 ^{ab}	18.75±24.13 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	8.33±12.31 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	0.003
Dilatação da luz tubular	18.75±15.54 ^{bc}	43.75±15.54 ^a	29.17±17.94 ^{abc}	37.50±22.61 ^{ab}	27.08±7.22 ^{abc}	16.67±12.31 ^c	0.000
Túbulos em regeneração	6.25±11.31 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	16.67±12.31 ^a	0.00±0.00 ^b	2.08±7.22 ^b	0.000
Rompimento celular	50.00±15.08 ^{ab}	64.58±12.87 ^a	29.17±23.44 ^c	58.33±12.31 ^a	33.33±16.28 ^{bc}	31.25±18.84 ^{bc}	0.000
Oclusão da luz tubular	27.08±12.87 ^{ab}	35.42±12.87 ^a	25.00±0.00 ^{ab}	25.00±0.00 ^{ab}	20.83±9.73 ^b	27.08±7.22 ^{ab}	0.007
Degeneração tubular	41.67±12.31 ^b	60.42±12.87 ^a	25.00±0.00 ^c	45.83±17.94 ^{ab}	37.50±16.85 ^{bc}	25.00±10.66 ^c	0.000
Novos néfrons	6.25±11.31 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	16.67±12.31 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.000
Dilatação dos capilares	14.58±16.71 ^b	20.83±20.87 ^{ab}	35.42±27.09 ^a	35.42±24.91 ^a	39.58±19.82 ^a	22.92±19.82 ^{ab}	0.037
Espessamento do endotélio capilar	37.50±34.54	37.50±35.54	47.92±31.00	43.75±26.38	50.00±21.31	39.58±32.78	0.864
Aumento do volume glomerular	29.17±25.75	25.00±26.11	41.67±19.46	45.83±23.44	47.92±16.71	33.33±24.62	0.091
Redução do espaço de Bowman	10.42±16.71 ^b	12.50±19.94 ^b	0.00±0.00 ^b	4.17±9.73 ^b	45.83±17.94 ^a	0.00±0.00 ^b	0.000
Presença de eritrócitos	20.83±20.87	20.83±20.87	25.00±15.08	27.92±16.85	22.92±7.22	22.92±19.82	0.918
Infiltrado eosinofílico	2.08±7.22 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	8.33±12.31 ^{ab}	10.42±12.87 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.002
Infiltrado linfocitário	8.33±12.31 ^b	37.50±29.19 ^a	20.83±9.73 ^{ab}	27.08±19.82 ^{ab}	8.33±19.46 ^b	6.25±11.31 ^b	0.000
Melanomacrófagos	2.08±7.22	0.00±0.00	8.33±12.31	0.00±0.00	6.25±11.31	2.08±7.22	0.065

Com relação às alterações no baço (Figura 4 e Tabela 4), EO_T apresentou menos centros de melanomacrófagos (MMC) do que NC_S e menor quantidade de melanomacrófagos soltos, em comparação com NC_S, NC_T e EO_S; houve menos necrose em EO_T, EO_S, GA_S e NC_S do que em NC_T.

Figura 4: Alterações histológicas do baço de *Danio rerio* alimentados com *Lippia sidoides* EO. Em “a”, observa-se a presença de um baço normal (EO_T); o asterisco em “b” evidencia a polpa vermelha e a seta aponta a polpa branca de um baço normal (EO_T); em “c”, observa-se necrose (seta) (NC_T); em “d”, tem-se a presença de centro de melanomacrófago (asterisco) e melanomacrófagos soltos (cabeça de seta) (NC_T).

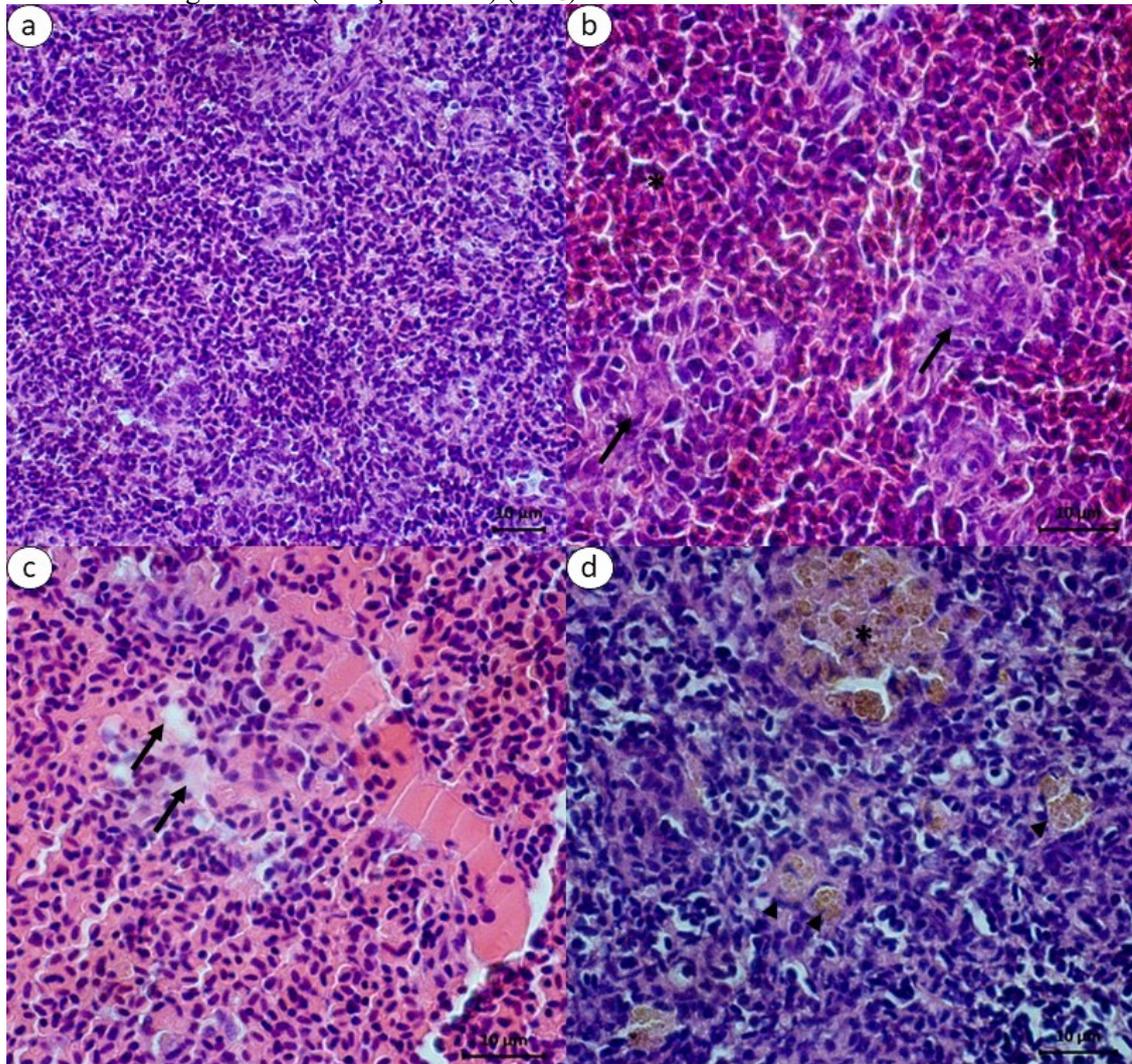


Tabela 4: Alterações histológicas do baço de *Danio rerio*. Óleo essencial de *Lippia sidoides* (EO), controle negativo (NC), dieta suplementada somente com álcool de cereais (GA), injeção com solução salina 0.65 % (s) e injeção com Carcinoma Ascítico de Ehrlich (τ). Dados apresentados como média e desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais pelo Teste de Tukey (p <0.05).

Alteração histológica	NCs	NCτ	GAs	GAr	EOs	EOτ	p value
Perda da integridade da polpa branca	4.17±9.73	8.33±19.46	8.33±12.31	12.50±13.06	2.08±7.22	4.17±9.73	0.218
Perda da integridade da polpa vermelha	4.17±9.73	8.33±19.46	8.33±12.31	12.50±13.06	2.08±7.22	4.17±9.73	0.218
Perda da integridade da cápsula fibrosa	0.00±0.00	8.33±19.46	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.17±9.73	0.132
Centro de melanomacrófagos	29.17±9.73 ^a	25.00±0.00 ^{ab}	22.92±19.82 ^{ab}	22.92±16.71 ^{ab}	25.00±0.00 ^{ab}	10.42±12.87 ^b	0.013
Melanomacrófagos soltos	25.00±0.00 ^a	25.00±0.00 ^a	22.92±19.82 ^{ab}	22.92±16.71 ^{ab}	25.00±0.00 ^a	10.42±12.87 ^b	0.024
Necrose	14.58±12.87 ^{bc}	37.50±13.06 ^a	20.83±9.73 ^{bc}	25.00±0.00 ^{ab}	12.50±13.06 ^{bc}	8.33±12.87 ^c	0.000
Infiltrado eosinofílico	4.17±9.73	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.08±7.22	0.205
Infiltrado linfocitário	0.00±0.00	0.00±0.00	4.17±14.43	8.33±19.46	8.33±12.31	0.00±0.00	0.163
Congestão	8.33±12.31 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	6.25±11.31 ^{ab}	0.005
Esteatose	0.00±0.00	0.00±0.00	6.25±11.31	4.17±9.73	0.00±0.00	2.08±7.22	0.121

No intestino (Figura 5 e Tabela 5), houve aumento do número, da área e do perímetro dos vilos em EO_T e GA_S, em comparação com NC_S, NC_T, GA_T e EO_S; em EO_T, registrou-se maior comprimento dos vilos, em relação aos EO_S, GA_T, NC_S e NC_T, bem como maior quantidade de células caliciformes, se comparado aos NC_S, NC_T, GA_S e GA_T; observou-se que EO_T, GA_T e GA_S apresentaram redução do infiltrado eosinofílico em relação aos NC_T e EO_S; em EO_T houve, ainda, menor vacuolização do que em NC_S, NC_T e GA_S.

Figura 5: Alterações histológicas do intestino de *Danio rerio* alimentados com *Lippia sidoides* EO. Em “a”, observa-se órgão com vilos íntegros (EO_T); as cabeças de seta em “b” evidenciam o maior grande número de células caliciformes (cabeça de seta), bem como vilos mais compridos e mais largos (EO_T); em “c”, os vilos possuem menor comprimento e menos células caliciformes (cabeça de seta) (NC_T); em “d”, tem-se a presença de infiltrado eosinofílico (cabeça de seta) (NC_T).

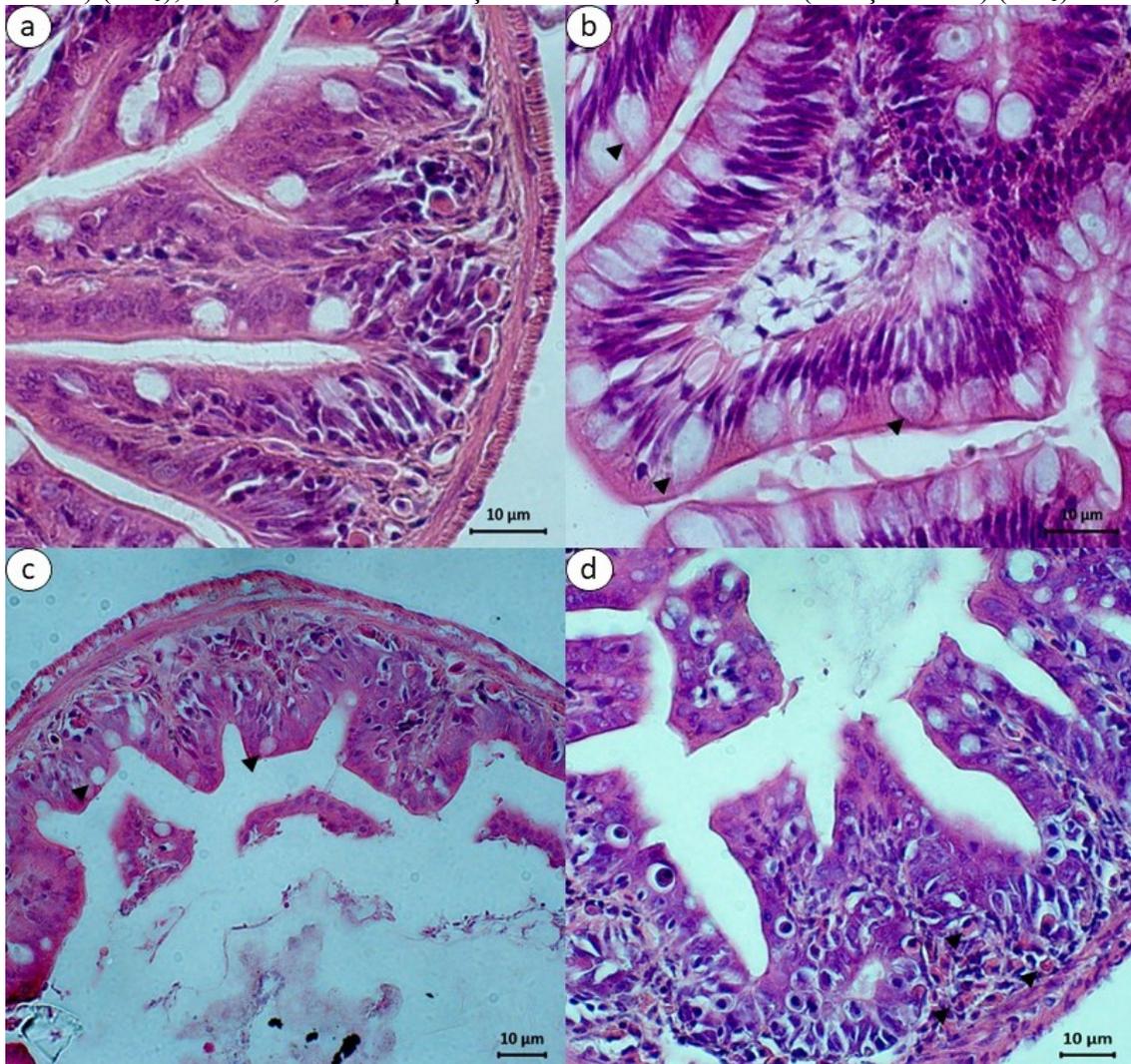


Tabela 5: Alterações histomorfométricas da porção média do intestinal de *Danio rerio*. Óleo essencial de *Lippia sidoides* (EO), controle negativo (NC), dieta suplementada somente com álcool de cereais (GA), injeção com solução salina 0.65 % (s) e injeção com Carcinoma Ascítico de Ehrlich (T). Dados apresentados como média e desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$).

Alteração histomorfométrica	NCs	NCt	GAs	GAt	EOs	EOt	p value
Número de vilos	16.08±2.39 ^c	17.08±1.83 ^c	26.75±1.76 ^a	19.50±1.68 ^b	15.67±1.37 ^c	26.08±2.35 ^a	0.000
Comprimento médio dos vilos (µm)	116.98±17.53 ^d	118.41±18.13 ^c	208.99±49.72 ^{ab}	165.78±59.35 ^{bc}	153.67±18.02 ^{cd}	232.30±43.65 ^a	0.000
Largura média dos vilos (µm)	48.26±16.42 ^b	70.41±22.26 ^{ab}	77.79±14.78 ^a	67.18±10.87 ^{ab}	77.75±29.42 ^a	70.09±19.94 ^{ab}	0.006
Número de células calciformes	88.58±16.71 ^d	117.25±55.69 ^c	159.00±12.53 ^b	154.25±26.44 ^{bc}	181.50±23.32 ^{ab}	210.33±30.82 ^a	0.000
Area média dos vilos (µm ²)	99053.18± 32835.39 ^c	194061.64± 82641.15 ^{bc}	593336.94± 193121.88 ^a	260492.84± 106081.53 ^b	261776.49± 91906.72 ^b	485268.65± 110478.92 ^a	0.000
Perímetro médio dos vilos (µm)	5953.95± 1374.01 ^c	7990.28± 1720.60 ^{bc}	18517.12± 3698.27 ^a	10192.78± 2485.78 ^b	9018.58± 1422.55 ^b	19554.47± 3383.77 ^a	0.000
Infiltrado eosinofílico	16.67±12.31 ^{ab}	25.00±0.00 ^a	12.50±13.06 ^b	6.25±11.31 ^b	25.00±0.00 ^a	6.25±11.31 ^b	0.000
Infiltrado linfocitário	0.00±0.00 ^b	12.50±13.06 ^{ab}	22.92±16.71 ^a	12.50±13.06 ^{ab}	10.42±12.87 ^{ab}	4.17±9.73 ^b	0.001
Melanomacrófagos	2.08±7.22	0.00±0.00	0.00±0.00	6.25±11.31	4.17±14.43	2.08±7.22	0.443
Necrose	20.83±20.87	22.92±19.82	20.83±9.73	18.75±11.31	18.75±18.84	14.58±12.87	0.867
Vacuolização	27.08±16.71 ^a	35.42±16.71 ^a	27.08±16.71 ^a	18.75±11.31 ^{ab}	20.83±17.94 ^{ab}	6.25±11.31 ^b	0.001

4. Discussão

Os constituintes químicos de uma determinada espécie vegetal comumente variam, em termos de tipo e concentração, em função de múltiplos fatores. Entre eles, destacam-se pluviosidade, clima, período do dia, região geográfica, variedade e idade da planta, bem como método de secagem e de extração do óleo essencial (Fontenelle et al., 2007). Assim como no presente estudo, Baldim et al. (2019) identificaram que o timol foi o composto majoritário do LSEO, com 68.22 %, seguido do *p-cimeno* (9,43 %). Destaca-se, nesse contexto, que a atividade biológica dos EO está intrinsecamente relacionada ao seu elemento com maior concentração, porém os efeitos sinérgicos da sua gama de constituintes são relevantes (Veras et al., 2012; Trombin de Souza et al., 2022).

Alguns compostos derivados de plantas, a exemplo dos terpenos, grupo do qual o timol faz parte, têm reconhecido potencial antioxidante e podem, por isso, estar envolvidos em atividades antitumorais, em decorrência do poder citotóxico contra células tumorais (Liu, 2004; Li e Oberley, 1997; Ruby et al, 1995; Nascimento et al, 2006). Embora não tenham relatado diferenças estatisticamente significativas, Santos et al. (2016) observaram que o uso do extrato hidroalcoólico de *Euphorbia tirucalli* (125 mg kg⁻¹) reduziu o volume ascítico total e o número total de células tumorais em ratos Swiss previamente injetados com CAE. De modo similar, Meireles et al. (2016) relataram que a utilização de EO de *Croton polyandrus* Spreng. (100 ou 150 mg kg⁻¹) administrado para ratos inibiu o crescimento tumoral, com redução do volume e da viabilidade celular de CAE.

Ressalta-se, todavia, que no presente estudo, a avaliação do efeito do LSEO foi realizada sobre o processo inflamatório induzido pelo CAE e não sobre as células tumorais propriamente ditas. De acordo com Fecchio et al. (1990), o implante desse tumor é suficiente para induzir a uma resposta inflamatória local, com aumento da permeabilidade vascular, formação de edema intenso, migração celular e progressiva produção de fluido ascítico. Embora não tenhamos observado nitidamente a dilatação abdominal nos peixes, conseguimos coletar o líquido ascítico, fluido essencial para o crescimento do tumor, na medida em que constitui uma fonte nutricional direta para as células de CAE (Gupta et al., 2004).

A resposta inflamatória nos vertebrados é responsável pela modulação inicial da defesa inata, até que a imunidade específica seja adquirida (Prado et al., 2018). Durante esse processo nos peixes, a migração de leucócitos da corrente sanguínea para o sítio da inflamação é o evento mais característico da fase aguda (Suzuki e Iida, 1992). Ao analisarem as células do exsudato obtido após períodos de 3 h a 72 h da injeção de carragenina na bexiga natatória de *Oreochromis*

niloticus, Reiko Matushima e Matiano (1996) observaram que, diferentemente do presente estudo, os trombócitos foram as células predominantes. Semelhantemente ao reportado aqui, esses autores registraram quantidades pouco expressivas de macrófagos, granulócitos e outras células não caracterizadas morfofuncionalmente.

Diferentemente do observado no presente estudo, em que o LSEO aparentemente não exerceu influência sobre a quantidade celular no líquido ascítico, em relação aos demais grupos, Martins et al. (2008) relataram aumento do número de células no exsudato de *O. niloticus* alimentadas com dieta suplementada com vitaminas C e E durante 30 dias antes da indução do processo inflamatório. Dotta et al. (2015) também perceberam aumento na contagem de leucócitos no exsudato da bexiga natatória de peixes suplementados com extratos naturais de própolis e *Aloe barbadensis* injetados com carragenina.

Enquanto registramos uma quantidade de neutrófilos estatisticamente igual entre EO_T e os demais tratamentos, exceto GA_T, que teve maior número dessa célula, Rodrigues-Soares et al. (2018) relataram que *O. niloticus* alimentadas por 45 dias com ração seca contendo *L. alba* EO (4 mL kg⁻¹) e injetadas com carragenina apresentaram menor quantidade desse tipo celular que os demais tratamentos. Embora nossos registros não tenham demonstrado diferenças relevantes, Santos et al. (2016) e Bergami-Santos et al. (2004) afirmam que já se demonstrou que a resposta inflamatória neutrofílica é essencial para o controle tumoral, porém o alto influxo dessas células pode promover o desenvolvimento de CAE. Adicionalmente, como sugerido por Ranzani-Paiva e Silva-Souza (2004) e Rodrigues-Soares et al. (2018), é possível que o tempo de 6 h após a injeção de CAE no peritônio de *D. rerio* não tenha sido suficiente para migração dos neutrófilos, seguido dos macrófagos, processo que caracteriza a resposta aguda do processo inflamatório

O fato de os animais do tratamento EO_T terem apresentado valores estatisticamente iguais aos dos demais grupos, para leucócitos totais e linfócitos, e aumento da quantidade de monócitos e basófilos, em relação àquela reportada para NC, sugere que o LSEO ao menos manteve o perfil de migração celular para o foco inflamatório, dando condições àqueles animais injetados com CAE de combaterem a injúria sofrida. Junto a outras células, os monócitos e basófilos participam da mediação das atividades do sistema imunológico inato, atuando na defesa do hospedeiro contra organismos invasores (Thrall, 2019). Nesse sentido, o fato de seus valores aparecerem mais elevados nos peixes suplementados com LSEO e injetados com CAE pode significar um efeito imunomodulador, sugerindo que o fitoterápico tenha ativado os mecanismos de defesa e favorecido a saúde dos animais (Chakraborty e Hancz, 2011).

Em todos os órgãos analisados no presente estudo, a partir da técnica histológica, observaram-se nítidas melhorias das condições teciduais dos peixes do tratamento EO_T em relação aos demais. Resultados similares foram obtidos por Dawood et al. (2020), que notaram que *O. niloticus* expostas ao organofosforado clorpirifós e alimentadas com ração contendo óleo de mentol (EOM) mantiveram os tecidos hepático e intestinal íntegros. Na ocasião, a adição do óleo melhorou a porção hepática, proporcionando um tecido com hepatócitos sem degeneração ou congestão de sinusoides sanguíneos; em relação ao intestino, manteve os vilos intestinais normais e com maior comprimento, as camadas da parede aderidas umas às outras e saudáveis, bem como a proteção da mucosa. A histoarquitetura hepática de carpas *Cyprinus carpio* alimentadas por 30 dias com dieta contendo *Origanum vulgare* EO também se apresentou normal, com canalículos da bile, ácidos pancreáticos e aspecto cordonal mantidos, bem como tecido renal íntegro (glomérulo, epitélio de revestimento, túbulos e espaço de Bowman) (Khafaga et al., 2020).

De acordo com El Euony et al. (2020), o uso de 500 ppm de *Thymus vulgaris* EO (TVEO) por um mês em dietas para *Clarias garipenus* submetidos ao neonicotinoide tiametoxican promoveu a manutenção da integridade histológica de órgãos como fígado, rim e baço. Semelhante ao encontrado por nós, esses autores afirmaram que o fígado apresentou lesões menos graves e menos distribuídas; o parênquima renal foi restaurado, com glomérulos de tamanhos dentro do esperado, bem como com túbulos renais, espaço de Bowman, luz tubular, infiltrados e tecido intersticial preservados; quanto ao baço, embora não tenham reportado diferenças significativas em relação ao controle, os autores perceberam um parênquima esplênico íntegro, sem depleção de linfócito ou necrose, bem como com as polpas branca e vermelha íntegras, sinusoides não dilatados, sem hemorragia e com MMC distribuídos de modo ordenado e pouco espalhados pelo tecido.

Os MMC, agregados de macrófagos fortemente pigmentados presentes no rim, baço e fígado dos vertebrados, são essenciais para o sistema de defesa dos peixes (Fournie et al. 2001; Kurtović et al., 2008). O número e o tamanho dos MMC podem ser aumentados sob condições de estresse, quando fagocitam agentes infecciosos, levando-os aos linfócitos até que o corpo do peixe seja estimulado e produza anticorpos (Steinel e Bolnick, 2017). A manutenção dos valores de MMC no baço dos *D. rerio* do grupo EO_T, em relação aos demais tratamentos, mesmo naqueles que receberam SS ao invés de CAE, sugere que o LSEO teve a capacidade de manter a função desses macrófagos pigmentados mesmo diante da presença das células tumorais.

Em geral, o efeito positivo do LSEO nos órgãos de *D. rerio* do presente estudo pode ser atribuído à sua propriedade antibacteriana, fortemente associada ao seu composto majoritário,

o timol (Bakkali et al., 2008). No entanto, informações recentes dão conta de que a atividade, em especial a anticancerígena e anti-inflamatória, dos EO deve ser analisada sob a ótica da significativa teoria da ação sinérgica, enfatizando a importância de estudar o óleo essencial como um todo, ao invés de seus componentes separadamente (Bhalla et al., 2013). Nesse contexto, os peixes do tratamento EO_T, embora tenham sido afetados pela injeção com CAE, podem ter conseguido promover, por meio da dieta suplementada, um desbalanço na MI, favorecendo bactérias benéficas em detrimento daquelas prejudiciais ao organismo, tal como sugerido por Viola e Vieira (2007) e Chagas et al. (2020). Em consequência disso, ao fornecer energia para multiplicação de bactérias entéricas benéficas, sugere-se que o LSEO tenha proporcionado maior capacidade de digestão intestinal e imunidade local, ocasionando elevação da digestibilidade alimentar e da função fisiológica (Padala et al., 2018; Melo-Bolívar et al., 2021).

5. Conclusão

O óleo essencial de *L. sidoides* foi capaz, em certa medida, de manter a quantidade e o perfil de células do exsudato em relação aos demais tratamentos, mesmo nos animais injetados com Carcinoma Ascítico de Ehrlich. Além disso, sua suplementação na ração melhorou as condições histológicas do fígado, rim e baço dos peixes. No intestino dos peixes suplementados, o aumento da quantidade, comprimento, área e perímetro dos vilos, bem como do número de células calciformes foram resultados importantes, sugerindo influência sobre o equilíbrio de bactérias entéricas.

Referências

ADAMS R.P; SPARKMAN O.D. Review of identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, p. 803-806, 2007.

ALMEIDA, Macia Cleane S. de et al. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, v. 33, p. 1877-1881, 2010.

BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALDIM, Iara et al. *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-Candida agent. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 73-81, 2019.

BERGAMI-SANTOS, Patrícia C.; MARIANO, Mário; BARBUTO, José Alexandre M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 245-255, 2004.

BHALLA, Yashika; GUPTA, Vinay Kumar; JAITAK, Vikas. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3643-3653, 2013.

BRUM, Aline et al. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 490, p. 98-107, 2018.

CHAGAS, Edsandra Campos et al. Composition of essential oils of *Mentha* species and their antimicrobial activity against *Aeromonas* spp. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 3, p. 209-215, 2020.

CHAKRABORTY, Suman Bhusan; HANCZ, Csaba. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. **Reviews in Aquaculture**, v. 3, n. 3, p. 103-119, 2011.

DAIRIKI, J. K. et al. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. **Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2013.

DAMMSKI, Ana Paula et al. Zebrafish: manual de criação em biotério. **Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná**, p. 20-1, 2011.

DAWOOD, Mahmoud AO et al. The impact of menthol essential oil against inflammation, immunosuppression, and histopathological alterations induced by chlorpyrifos in Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 102, p. 316-325, 2020.

DOTTA, G. et al. Acute inflammation and hematological response in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and *Aloe barbadensis*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 491-496, 2015.

EL EUONY, Omnia I. et al. Modulatory role of dietary *Thymus vulgaris* essential oil and *Bacillus subtilis* against thiamethoxam-induced hepatorenal damage, oxidative stress, and immunotoxicity in African catfish (*Clarias garipenus*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 18, p. 23108-23128, 2020.

FAGUNDES, Djalma José; TAHA, Murched Omar. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, p. 59-65, 2004.

FECCHIO, Denise et al. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 125-132, 1990.

FERNANDES, Luciana P. et al. Volatile retention and antifungal properties of spray-dried microparticles of *Lippia sidoides* essential oil. **Drying Technology**, v. 26, n. 12, p. 1534-1542, 2008.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

FOURNIE, John W. et al. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 13, n. 2, p. 105-116, 2001.

RI, Freshney. Freshney's culture of animal cells, a multimedia guide. **Hoboken: Wiley-Liss**, 1999.

GARMUS, Tábata T. et al. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 68-75, 2015.

GRUSH, J.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, v. 1, n. 1, p. 46-53, 2004.

GUPTA, Malaya et al. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, p. 1070-1076, 2004.

HOWE, Kerstin et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.

HUMASON, Gretchen L. et al. Animal tissue techniques. **Animal Tissue Techniques**, 1962.

KHAFAGA, Asmaa F. et al. Dietary *Origanum vulgare* essential oil attenuates cypermethrin-induced biochemical changes, oxidative stress, histopathological alterations, apoptosis, and reduces DNA damage in Common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquatic Toxicology**, v. 228, p. 105624, 2020.

KURTOVIĆ, Božidar; TESKEREDŽIĆ, Emin; TESKEREDŽIĆ, Zlatica. Histological comparison of spleen and kidney tissue from farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Acta Adriatica**, v. 49, n 2, p. 147-154, 2008.

LI, Jian-Jian; OBERLEY, Larry W. Overexpression of manganese-containing superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor α and/or hyperthermia. **Cancer Research**, v. 57, n. 10, p. 1991-1998, 1997.

LIU, Rui Hai. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479S-3485S, 2004.

MARTINS, M. L. et al. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. **Revista de Ictiologia**, v. 9, n. 1-2, p. 25-31, 2001.

- MARTINS, Maurício Laterça et al. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, p. 31-39, 2006.
- MARTINS, Maurício Laterça et al. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. **Ciência Rural**, v. 38, p. 213-218, 2008.
- MEIRELES, Déborah RP et al. Toxicity and antitumor efficacy of *Croton polyandrus* oil against Ehrlich ascites carcinoma cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 751-758, 2016.
- MELO-BOLÍVAR, Javier Fernando et al. Multistrain probiotics use in main commercially cultured freshwater fish: a systematic review of evidence. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 1758-1780, 2021.
- MOORE, John C. et al. Single-cell imaging of normal and malignant cell engraftment into optically clear prkdc-null SCID zebrafish. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 12, p. 2575-2589, 2016.
- NASCIMENTO, Flávia RF et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v. 78, n. 22, p. 2650-2653, 2006.
- OZASLAN, Mehmet et al. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.
- PADALA, Dharmakar et al. Growth promoter effect of peppermint (*Mentha piperita*) on rohu (*Labeo rohita*). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 6, p. 537-9, 2018.
- PRADO, Ed Johnny R. et al. Insulin favors acute inflammatory reaction in alloxan-diabetic tilapia during infectious aerocystitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 2190-2193, 2018.
- RANZANI-PAIVA, Maria José Tavares; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de peixes brasileiros. **Sanidade de Organismos Aquáticos**, p. 86-120, 2004.
- REIKO MATUSHIMA, Eliana; MATIANO, Mário. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 5-10, 1996.
- RODRIGUES-SOARES, Jorge Pedro et al. Induced aerocystitis and hemato-immunological parameters in Nile tilapia fed supplemented diet with essential oil of *Lippia alba*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 1, p. 1-12, 2018.
- RUBY, Alan J. et al. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. **Cancer Letters**, v. 94, n. 1, p. 79-83, 1995.
- SANTOS, Orlando José dos et al. Use of raw *Euphorbia tirucalli* extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, p. 18-21, 2016.

SCHWAIGER, Julia et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SHOFF, Suzanne M. et al. Concentration-dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. **Cancer Research**, v. 51, n. 1, p. 37-42, 1991.

STEINEL, Natalie C.; BOLNICK, Daniel I. Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 827, 2017.

THRALL, Donald E. **Diagnóstico de Radiologia Veterinária**. Elsevier Editora Ltda., 2019.

TROMBIN DE SOUZA, Michele et al. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* ecotypes and their major compounds: insecticidal and histological assessment against *Drosophila suzukii* and their impact on a nontarget parasitoid. **Journal of Economic Entomology**, v. 115, n. 4, p. 955-966, 2022.

TEAME, Tsegay et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 3, p. 68-77, 2019.

VERAS, Helenicy NH et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 508-512, 2012.

VIOLA, Eduardo Spillari; VIEIRA, Sergio Luiz. Supplementation of organic and inorganic acidifiers in diets for broiler chickens: performance and intestinal morphology. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1097-1104, 2007.

SUZUKI, Yuzuru; IIDA, Takaji. Fish granulocytes in the process of inflammation. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 149-160, 1992.

2 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *L. sidoides* na concentração de 0,25% na ração, administrado durante 15 dias, foi benéfico para os peixes *D. rerio* na medida em que alterou a microbiota intestinal, aumentando a riqueza, diversidade e abundância das espécies de bactérias. O fitoterápico inibiu o crescimento de algumas espécies de bactérias potencialmente patogênicas, aliviou o estresse oxidativo, observado a partir da análise das enzimas do fígado de *D. rerio*, bem como atuou na manutenção da integridade do parênquima hepático, renal e esplênico.

O aumento do número, comprimento e largura de vilos, e a elevação da quantidade de células caliciformes e da área dos vilos sugerem que a suplementação dietária com o óleo, ao melhorar a microbiota intestinal, permite que o peixe tenha a função digestiva aumentada, aproveitando melhor os nutrientes do alimento.

Em relação à contagem total e diferencial de leucócitos recuperados do exsudato dos *D. rerio* inoculados com Carcinoma Ascítico de Erlich, percebeu-se que, em certa medida, o óleo manteve a quantidade e o perfil de células em relação ao observado nos demais tratamentos. O aumento da quantidade de monócitos e basófilos nos animais suplementados com LSEO e injetados com Carcinoma Ascítico de Erlich sugere que o fitoterápico tenha ativado os mecanismos de defesa e favorecido a saúde dos animais.

Portanto, a suplementação dietária com o óleo na concentração de 0,25%, durante 15 dias, foi benéfica para a saúde de *D. rerio*.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Executar um trabalho em nível de doutorado é uma honra, ao mesmo tempo em que traz uma responsabilidade enorme. Ainda somos poucos num país sedento por educação, sedento por profissionais qualificados. Atualmente, os desafios parecem ainda maiores, e chegar ao fim dos experimentos e defender a tese é uma vitória.

Aliado às restrições impostas pela pandemia do COVID, que fechou muitos laboratórios por quase 2 anos, o corte de recursos para consecução de projetos nas Universidades Públicas brasileiras afetou fortemente a consecução das pesquisas no país. A ausência, ainda que temporária em função da pandemia, dos profissionais que atuam nos laboratórios, a falta de reagentes químicos para consecução de algumas análises e o cenário de insegurança e desânimo de muitos colegas (falta de bolsa, problemas associados à saúde mental) talvez tenham constituído os elementos mais desoladores de meu percurso enquanto aluno de doutorado. No meu caso em específico, semelhante ao que ocorre com a grande massa populacional do nosso Brasil, em que os estudos concorrem com o trabalho, foi necessário avançar a madrugada para produzir um trabalho com a qualidade que a sociedade merece.

Essa tese é resultado do trabalho de muitas mentes e foi produzido a muitas mãos. Tem o suor de quem não teve a oportunidade de chegar aos bancos de uma universidade, por exemplo, mas também tem o esforço de quem já percorreu o mesmo percurso que o meu e agora é capaz de auxiliar.

A realização dessa pesquisa foi extremamente importante para evidenciar, ainda mais, a importância da utilização dos fitoterápicos para o fortalecimento da saúde dos animais como um todo, inclusive para os seres humanos.

Esse trabalho não começou aqui e não termina aqui. Outras investigações devem ser realizadas para fortalecer os conhecimentos já solidificados e para possibilitar novas descobertas, descobrir novas matérias-primas, outros usos para os fitoterápicos.

É preciso ter fôlego para ser pesquisador no nosso país. É necessário querer muito transformar nossa própria realidade e a realidade da sociedade. É preciso estar atento aos investimentos que os cidadãos realizam para nos manter nos bancos da universidade. Não é tarefa fácil... é preciso resistir, insistir, persistir.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABDEL-LATIF, Hany MR et al. Dietary oregano essential oil improved the growth performance via enhancing the intestinal morphometry and hepato-renal functions of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. **Aquaculture**, v. 526, p. 735432, 2020.

ABU-SERIE, Marwa M.; HABASHY, Noha H.; MAHER, Adham M. In vitro anti-nephrotoxic potential of *Ammi visnaga*, *Petroselinum crispum*, *Hordeum vulgare*, and *Cymbopogon schoenanthus* seed or leaf extracts by suppressing the necrotic mediators, oxidative stress and inflammation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2019.

ADAMS R.P.; SPARKMAN O.D. Review of identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**. 18, p. 803-806, 2007.

ADDAM, Kennya Gomes Silva et al. Dietary organic acids blend alone or in combination with an essential oil on the survival, growth, gut/liver structure and de hemato-immunological in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 10, p. 2960-2971, 2019.

ADEL, Milad et al. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 841-847, 2015.

ADORJAN, Barbara; BUCHBAUER, Gerhard. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407-426, 2010.

AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. In: Methods in enzymology. **Academic Press**, 1984. p. 121-126.

ALBERTS B.; BRAY D.; WATSON J. Molecular biology of the cell. 5 ed. New York: **Taylor & Francis**, p. 1555, 2008.

AL-SAGHEER, A. A. et al. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 1006-1014, 2018.

AL-SNAI, A. E. Pharmacological and therapeutic effects of *Lippia nodiflora* (Phyla nodiflora). **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 9, n. 8, p. 15-25, 2019.

AOUADI, Dorra et al. The antioxidant status and oxidative stability of muscle from lambs receiving oral administration of *Artemisia herba alba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Meat Science**, v. 97, n. 2, p. 237-243, 2014.

ARTIS, David; SPITS, Hergen. The biology of innate lymphoid cells. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 293-301, 2015.

- ASHOKKUMAR, Durairaj et al. Effect on inhibition of proliferation and antioxidant enzyme level of *Lippia nodiflora* in EAC cell line treated mice. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 6, n. 1, 2009.
- AWAD, Elham; AWAAD, Amani. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 67, p. 40-54, 2017.
- AZAB, Abdullatif; NASSAR, Ahmad; AZAB, Abed N. Anti-inflammatory activity of natural products. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1321, 2016.
- BABICKI, Sasha et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W147-W153, 2016.
- BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BALKWILL, Frances; CHARLES, Kellie A.; MANTOVANI, Alberto. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v. 7, n. 3, p. 211-217, 2005.
- BARBAZUK, W. Bradley et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, 2000.
- BATISTA, R. S. A. et al. Atividade antifúngica de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *Candida* spp. **Agropecuária Técnica**, v. 34, n. 1, p. 40-49, 2013.
- BAUMANN, Paul C. Epizootics of cancer in fish associated with genotoxins in sediment and water. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 411, n. 3, p. 227-233, 1998.
- BAUMANN, Paul C. The use of tumors in wild populations of fish to assess ecosystem health. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, v. 1, n. 2, p. 135-146, 1992.
- BEUTLER, Ernest. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-888, 1963.
- BILLER, Jaqueline D.; TAKAHASHI, Leonardo S. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 3403-3414, 2018.
- BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. [35] Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. In: *Methods in enzymology*. **Academic Press**, 1984. p. 299-305.
- BONASSA, Edva Moreno Aguilar; SANTANA, Tatiana Rocha. **Enfermagem em Terapêutica Oncológica**. Atheneu, 2005.
- BORGES, Raphaelle Sousa et al. Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: in vitro and in zebrafish studies. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 4, p. 1057-1080, 2018.

- BOSSÉ, Gabriel D.; PETERSON, Randall T. Development of an opioid self-administration assay to study drug seeking in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 335, p. 158-166, 2017.
- BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 349-356, 2007a.
- BOTELHO, M. A. et al. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 471-478, 2007b.
- BOTELHO, Marco A. et al. Nanotechnology in phytotherapy: antiinflammatory effect of a nanostructured thymol gel from *Lippia sidoides* in acute periodontitis in rats. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 1, p. 152-159, 2016.
- BOWSER, P. R.; WOOSTER, G. A.; EARNEST-KOONS, K. Effects of fish age and challenge route in experimental transmission of walleye dermal sarcoma in walleyes by cell-free tumor filtrates. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 9, n. 4, p. 274-278, 1997.
- BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL, Elenice M. et al. In vitro and in vivo antiparasitic action of essential oils of *Lippia* spp. in Koi Carp (*Cyprinus carpio*) fed supplemented diets. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 12, n. 3, p. 88-100, 2019.
- BRUM, Aline et al. Blood biochemical parameters and melanomacrophage centers in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 74, p. 444-449, 2018a.
- BRUM, Aline et al. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 468, p. 235-243, 2017.
- BRUM, Aline et al. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 490, p. 98-107, 2018b.
- CABALLERO, Maria Virginia; CANDIRACCI, Manila. Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. **Journal of Unexplored Medical Data**, v. 3, p. 4, 2018.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 1-2, p. 167-170, 2008.
- CAO, Jinling et al. Sesamin attenuates histological alterations, oxidative stress and expressions of immune-related genes in liver of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to fluoride. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 106, p. 715-723, 2020.

CAO, Yu et al. Impact of food additives on the composition and function of gut microbiota: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 295-310, 2020a.

CARLBERG, Inger; MANNERVIK, Bengt. [59] Glutathione reductase. In: **Methods in Enzymology**. Academic press, 1985. p. 484-490.

CARVALHO, Ana Fontenele Urano et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 569-571, 2003.

CAVALCANTI, S. C. H. et al. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 829-832, 2010.

CHUN, Sung-Sook et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.

CHUNG, Samantha et al. Essential oil from ginger influences the growth, haematological and biochemical variables and histomorphometry of intestine and liver of Nile tilapia juveniles. **Aquaculture**, v. 534, p. 736325, 2021.

CHUNG, Samantha et al. Inclusion of essential oil from ginger in the diet improves physiological parameters of tambaqui juveniles (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 543, p. 736934, 2021a.

COPATTI, Carlos Eduardo et al. Addition of essential oil from *Lippia sidoides* to the diet of tambaqui: An analysis of growth, metabolic and blood parameters, and intestinal enzymes. **Aquaculture**, p. 738482, 2022.

COSTA, Sônia Maria O. et al. Chemical Constituents from *Lippia sidoides* and Cytotoxic Activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 6, p. 792-795, 2001.

COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72-79, 2005.

DA CUNHA, J. A.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens—a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 328-344, 2018.

DA ROCHA, Carlos Alberto Machado et al. A review on occurrence of neoplasia in fish/Uma revisão sobre a ocorrência de neoplasias em peixes. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, n. 2, p. 19-24, 2018.

DAIRIKI, J. K. et al. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. **Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2013.

DALE, Ole B. et al. From chronic feed-induced intestinal inflammation to adenocarcinoma with metastases in salmonid fish. **Cancer Research**, v. 69, n. 10, p. 4355-4362, 2009.

DAMMSKI, Ana Paula; MÜLLER, Bruno Roberto; GAYA, Carolina. **Manual de Criação em Biotério**. 2011.

DAWOOD, Mahmoud AO et al. The impact of menthol essential oil against inflammation, immunosuppression, and histopathological alterations induced by chlorpyrifos in Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 102, p. 316-325, 2020.

DAWOOD, Mahmoud AO; GEWAILY, Mahmoud S.; SEWILAM, Hani. The growth performance, antioxidative capacity, and histological features of intestines, gills, and livers of Nile tilapia reared in different water salinities and fed menthol essential oil. **Aquaculture**, v. 554, p. 738122, 2022.

DAWOOD, Mahmoud AO; NORELDIN, Ahmed E.; SEWILAM, Hani. Long term salinity disrupts the hepatic function, intestinal health, and gills antioxidative status in Nile tilapia stressed with hypoxia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 220, p. 112412, 2021.

DE ALENCAR-ARARIPE, Marcio Gomes et al. A clinical trial and oral wound treated by essential oil of *Lippia sidoides* mouthrinse in horses. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2014.

DE LIMA, Glauber Pacelli Gomes et al. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and Croton species against *Aedes aegypti* L. **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 1953-1958, 2013.

DE MELO, Joabe Gomes et al. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

DE OLIVEIRA HASHIMOTO, Gabriela Sayuri et al. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 450, p. 182-186, 2016.

DE PAIVA, Maria José Tavares Ranzani et al. Métodos para análise hematológica em peixes. **Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM**, 2013.

DE SOUZA GRINEVICIUS, Valdelúcia Maria Alves et al. Piper nigrum ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 189, p. 139-147, 2016.

DE SOUZA SILVA, Leyciane Tayana et al. Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of *Mentha piperita* after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 506, p. 205-211, 2019.

DEB, Dipanwita Dutta et al. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. **Chemico-biological Interactions**, v. 193, n. 1, p. 97-106, 2011.

- DEJEANS, Nicolas et al. Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 9, p. 1221-1230, 2010.
- DHAMA, Kuldeep et al. Medicinal and therapeutic potential of herbs and plant metabolites/extracts countering viral pathogens-current knowledge and future prospects. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 236-263, 2018.
- DISIS, Mary L. Immune regulation of cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 29, p. 4531, 2010.
- DOS REIS, Fernanda B. et al. Use of *Carnobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish model systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 228-234, 2011.
- DOS SANTOS, N. M. S. et al. Fish and apoptosis: molecules and pathways. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 2, p. 148-169, 2008.
- EMBUSCADO, Milda E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants—a mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811-819, 2015.
- ESTEBAN, M. Ángeles; MESEGUER, José; CUESTA, Alberto. Fighting virus and parasites with fish cytotoxic cells. **Health and Environment in Aquaculture** (ed. Carvalho, ED, David, GS, Silva, RJ), p. 277-302, 2012.
- EVANS, Patricia; HALLIWELL, Barry. Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 884, n. 1, p. 19-40, 1999.
- EZZAT ABD EL-HACK, Mohamed et al. Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 28, n. 5, p. 365-382, 2016.
- FAO. 2019. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2017/FAO anuario. **Estadísticas de Pesca y Acuicultura** 2017. Rome/Roma.
- FARAG, Mayada R. et al. Neurobehavioral, physiological and inflammatory impairments in response to bifenthrin intoxication in *Oreochromis niloticus* fish: Role of dietary supplementation with *Petroselinum crispum* essential oil. **Aquatic Toxicology**, v. 231, p. 105715, 2021.
- FERNANDES, José Veríssimo et al. The role of the mediators of inflammation in cancer development. **Pathology & Oncology Research**, v. 21, n. 3, p. 527-534, 2015.
- FLOHÉ, Leopold; GÜNZLER, Wolfgang A. [12] Assays of glutathione peroxidase. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 1984. p. 114-120.
- FLORES-LOPES, Fábio et al. Alterações histológicas em placas ósseas do peixe cascudo *Rineloricaria strigilata* (Hensel)(Teleostei, loricariidae) e sua frequência no lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, p. 699-709, 2001.

GABRIEL, Ndakalimwe Naftal. Review on the progress in the role of herbal extracts in tilapia culture. **Cogent Food & Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 1619651, 2019.

GAMES, Ellen et al. Structurally related monoterpenes p-cymene, carvacrol and thymol isolated from essential oil from leaves of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) protect mice against elastase-induced emphysema. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1390, 2016.

GEWAILY, Mahmoud S. et al. Dietary synbiotics can help relieve the impacts of deltamethrin toxicity of Nile tilapia reared at low temperatures. **Animals**, v. 11, n. 6, p. 1790, 2021.

GHAFARIFARSANI, Hamed; KACHUEI, Reza; IMANI, Ahmad. Dietary supplementation of garden thyme essential oil ameliorated the deteriorative effects of aflatoxin B1 on growth performance and intestinal inflammatory status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 531, p. 735928, 2021.

GIANNENAS, I. et al. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 350, p. 26-32, 2012.

GOES, Elenice Souza dos Reis et al. Imbalance of the redox system and quality of tilapia fillets subjected to pre-slaughter stress. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0210742, 2019.

GOMIDE, Mayna da S. et al. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 895-902, 2013.

GONG, H.Y. et al. Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 1, p. 25-32, 2014.

GOODWIN, Nicola et al. Standardized welfare terms for the zebrafish community. **Zebrafish**, v. 13, n. S1, p. S-164-S-168, 2016.

GORDON, John R.; BURD, Parris R.; GALLI, Stephen J. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. **Immunology Today**, v. 11, p. 458-464, 1990.

GRUSH, J.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, v. 1, n. 1, p. 46-53, 2004.

GUIMARÃES, Luiz Gustavo de L. et al. General characteristics, phytochemistry and pharmacognosy of *Lippia sidoides*. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 11, p. 1934578X1501001116, 2015.

GUIMARÃES, Luiz Gustavo de Lima et al. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 267-275, 2014.

- GUO, Jinshu et al. The PFOS disturbed immunomodulatory functions via nuclear Factor- κ B signaling in liver of zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 91, p. 87-98, 2019.
- HAMMER, Øyvind et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HARSHBARGER, J.C.; CLARK, u JB. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America. **Science of the Total Environment**, v. 94, n. 1-2, p. 1-32, 1990.
- HASSAN, Wafaa et al. The chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lavandula coronopifolia* growing in Saudi Arabia. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 604-515, 2014.
- HEBERLE, Henry et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2015.
- HEPPNER, Frank L.; RANSOHOFF, Richard M.; BECHER, Burkhard. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 358-372, 2015.
- HOWE, Kerstin et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.
- HUANG, C. M.; LEE, T. T. Immunomodulatory effects of phytochemicals in chickens and pigs—A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 31, n. 5, p. 617, 2018.
- INCA (2019). Instituto Nacional de Câncer (2019) – INCA: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso eletrônico em 24 de setembro de 2019.
- INGALE, A. G. et al. Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. **African Journal of Plant Science**, v. 4, n. 10, p. 417-426, 2010.
- ISHIKAWA, Takatoshi; KUWABARA, Noriyuki; TAKAYAMA, Shozo. Spontaneous ovarian tumors in domestic carp (*Cyprinus carpio*): light and electron microscopy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 57, n. 3, p. 579-584, 1976.
- ISHIKAWA, Takatoshi; MASAHITO, Prince; TAKAYAMA, Shozo. Olfactory neuroepithelioma in a domestic carp (*Cyprinus carpio*). **Cancer Research**, v. 38, n. 11_Part_1, p. 3954-3959, 1978.
- JAAFARI, Abdeslam et al. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 534-540, 2012.

JATOBÁ, Adolfo et al. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1201-1207, 2008.

JESUS, Gabriel Fernandes Alves et al. Effects of sodium butyrate and *Lippia origanoides* essential oil blend on growth, intestinal microbiota, histology, and haemato-immunological response of Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 117, p. 62-69, 2021.

KALUEFF, Allan V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70-86, 2013.

KAPLAN, Edward L.; MEIER, Paul. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association**, v. 53, n. 282, p. 457-481, 1958.

KERROLA, Kaisli; GALAMBOSI, Bertalan; KALLIO, Heikki. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 776-781, 1994.

KHAFAGA, Asmaa F. et al. Dietary *Origanum vulgare* essential oil attenuates cypermethrin-induced biochemical changes, oxidative stress, histopathological alterations, apoptosis, and reduces DNA damage in Common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquatic Toxicology**, v. 228, p. 105624, 2020.

KNÜSEL, Ralph et al. Two independent cases of spontaneously occurring branchioblastomas in koi carp (*Cyprinus carpio*). **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 2, p. 237-239, 2007.

KRAUSOVA, Alzbeta et al. Plectin ensures intestinal epithelial integrity and protects colon against colitis. **Mucosal Immunology**, v. 14, n. 3, p. 691-702, 2021.

LEGAULT, Jean; PICHETTE, André. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 12, p. 1643-1647, 2007.

LEMOS, T. L. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, n. 2, p. 82-84, 1990.

LEVINE, Rodney L. et al. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 1990. p. 464-478.

LOANE, David J.; KUMAR, Alok. Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated. **Experimental Neurology**, v. 275, p. 316-327, 2016.

LOWRY, Oliver H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCAS, Sian-Marie; ROTHWELL, Nancy J.; GIBSON, Rosemary M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S232-S240, 2006.

LUO, Yangchao et al. Encapsulation of indole-3-carbinol and 3, 3'-diindolylmethane in zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release property and improved stability. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 224-230, 2013.

MA, Jun-Lei et al. Multi-omics analysis reveals the glycolipid metabolism response mechanism in the liver of genetically improved farmed Tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) under hypoxia stress. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, p. 1-16, 2021.

MACRAE, Calum A.; PETERSON, Randall T. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 10, p. 721-731, 2015.

MAGOUZ, Fawzy I. et al. Dietary menthol essential oil enhanced the growth performance, digestive enzyme activity, immune-related genes, and resistance against acute ammonia exposure in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 530, p. 735944, 2021.

MARSIK, Frank J. et al. Air– Surface Exchange of Gaseous Mercury over A Mixed Sawgrass– Cattail Stand within the Florida Everglades. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 13, p. 4739-4746, 2005.

MARTINS, M.L. et al. A method for collecting eggs of *Pseudocapillaria tomentosa* (Nematoda: Capillariidae) from zebrafish *Danio rerio* and efficacy of heat and chlorine for killing the nematode's eggs. **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 2, p. 169-182, 2017.

MATOS, FJ de A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham.: farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 79, n. 3, p. 84-87, 1998.

MBOKANE, Esau Matthews; MOYO, Ngonidzashe Adreck Gukuta. Effects of dietary levels of essential oil extracts from *Moringa oleifera* and *Artemisia afra* on kidney histology, haemato-immunological parameters and disease resistance in *Clarias gariepinus*. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 1, p. 410-425, 2020.

MCCORD, Joe M.; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MCGAHON, Anne J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in Cell Biology**, v. 46, p. 153-185, 1995.

MCGRATH, Patricia (Ed.). **Zebrafish: methods for assessing drug safety and toxicity**. John Wiley & Sons, 2012.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.

MENG, Rui et al. Alleviating effects of essential oil from *Artemisia vulgaris* on enteritis in zebrafish via modulating oxidative stress and inflammatory responses. **Fish & Shellfish Immunology**, 2022.

- MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Irwin. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.
- MITOSHI, Mai et al. Suppression of allergic and inflammatory responses by essential oils derived from herbal plants and citrus fruits. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 6, p. 1643-1651, 2014.
- MOHAMED, M. A. et al. Growth performance and histological changes in ileum and immune related organs of broilers fed organic acids or antibiotic growth promoter. **International Journal of Poultry Science**, v. 13, n. 10, p. 602, 2014.
- MONTEIRO, Maria Vivina Barros et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 378-382, 2007.
- MOORE, John C. et al. Single-cell imaging of normal and malignant cell engraftment into optically clear prkdc-null SCID zebrafish. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 12, p. 2575-2589, 2016.
- MOREL, Yannick; BAROUKI, Robert. Repression of gene expression by oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 342, n. 3, p. 481-496, 1999.
- NAEEMI, A. et al. Histopathological changes of gill, liver and kidney in *Caspian kutum* exposed to Linear Alkylbenzene Sulfonate. 2013.
- NAGARSHETH, Nisha; WICHA, Max S.; ZOU, Weiping. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 9, p. 559-572, 2017.
- NICHOLSON, Jeremy K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1262-1267, 2012.
- OURIQUE, Fabiana et al. In vivo inhibition of tumor progression by 5 hydroxy-1, 4-naphthoquinone (juglone) and 2-(4-hydroxyanilino)-1, 4-naphthoquinone (Q7) in combination with ascorbate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 4, p. 640-646, 2016.
- ÖZKAN, Aysun; ERDOĞAN, Ayşe. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, n. 6, p. 735-742, 2011.
- PARRIS, Nicholas; COOKE, Peter H.; HICKS, Kevin B. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4788-4792, 2005.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

PEREIRA, Scheila Anelise et al. Autochthonous probiotic *Lactobacillus* sp. in the diet of bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* improves weight gain, feed conversion and gut microbiota. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 5, p. 910-916, 2017.

PIERCE, Glenn F. Macrophages: important physiologic and pathologic sources of polypeptide growth factors. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 2, n. 3, p. 233-4, 1990.

PLATEL, Kalpana et al. Digestive stimulant action of three Indian spice mixes in experimental rats. **Food/Nahrung**, v. 46, n. 6, p. 394-398, 2002.

RAHMAN, Afaf N. Abdel et al. The ameliorative role of geranium (*Pelargonium graveolens*) essential oil against hepato-renal toxicity, immunosuppression, and oxidative stress of profenofos in common carp, *Cyprinus carpio* (L.). **Aquaculture**, v. 517, p. 734777, 2020.

RAJGOPAL, Arun et al. Immunomodulatory effects of *Lippia sidoides* extract: induction of IL-10 through cAMP and p38 MAPK-dependent mechanisms. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 3, p. 370-377, 2015.

RAMOS, A. et al. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 2-3, p. 241-246, 2003.

REIS, Marcelo. Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 39, n. 4, p. 577-586, 2006.

REVERTER, M. et al. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. **Aquaculture**, v. 433, p. 50-61, 2014.

ROCK, Kenneth L.; LAI, Jiann-Jyh; KONO, Hajime. Innate and adaptive immune responses to cell death. **Immunological Reviews**, v. 243, n. 1, p. 191-205, 2011.

RONIS, Martin JJ et al. Cytokine and chemokine expression associated with steatohepatitis and hepatocyte proliferation in rats fed ethanol via total enteral nutrition. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 3, p. 344-355, 2008.

SACCOL, Etiane MH et al. Addition of *Lippia alba* (Mill) NE Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416, p. 244-254, 2013.

SCHWAIGER, Julia et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SHAHID, S. et al. Histopathological alterations in gills, liver, kidney and muscles of *Ictalurus punctatus* collected from pollutes areas of River. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, p. 814-821, 2020.

SIKKEMA, J. A. N.; DE BONT, Jan A.; POOLMAN, Bert. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILVA JÚNIOR, A.A. Plantas medicinais. **EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina)**, 457 p. 1997.

SILVA, V. A. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. extract on biological isolates of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, p. 452-455, 2010.

SIRRI, Rubina et al. Seminoma in a koi carp *Cyprinus carpio*: histopathological and immunohistochemical findings. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 92, n. 1, p. 83-88, 2010.

SOARES, Bruna Viana; TAVARES-DIAS, Marcos. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SÖNMEZ, Adem Yavuz et al. Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 165-175, 2015.

SOUZA, Carine de Freitas et al. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: a review. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 785, 2019.

SPITSBERGEN, Jan M.; BUHLER, Donald R.; PETERSON, Tracy S. Neoplasia and Neoplasm-Associated Lesions in Laboratory Colonies of Zebrafish Emphasizing Key Influences of Diet and Aquaculture System Design. **Ilar Journal**, v. 53, n. 2, p. 114-125, 2012.

STEGEMAN, Nadia et al. Nephroblastoma in a Koi (*Cyprinus carpio*). **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 19, n. 4, p. 298-303, 2010.

SUBRAMANIAN, Sangeetha; MACKINNON, Shawna L.; ROSS, Neil W. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 148, n. 3, p. 256-263, 2007.

SUN, Jun-Long et al. Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 98, p. 923-936, 2020.

SUTILI, Fernando J. et al. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 3, p. 716-726, 2018.

SUTTIE, Andrew W. Histopathology of the spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 466-503, 2006.

TANIGUCHI, Koji; KARIN, Michael. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 309-324, 2018.

THATCHER, Vernon E.; VARELLA, Angela B. Patologia de peixes da Amazônia Brasileira. 2. Um tumor maligno das brânquias relacionado com as metacercárias de um trematódeo. **Acta Amazonica**, v. 10, p. 651-656, 1980.

THORGAARD, Gary H. et al. Tumor suppression in triploid trout. **Aquatic Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 121-126, 1999.

VALLEJOS-VIDAL, Eva et al. The response of fish to immunostimulant diets. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 56, p. 34-69, 2016.

VERMA, Nandini et al. Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 336, n. 1, p. 127-135, 2010.

VICCINI, L. F. et al. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1, p. 171-178, 2005.

WAHEED, Rania et al. Thermal stress accelerates mercury chloride toxicity in *Oreochromis niloticus* via up-regulation of mercury bioaccumulation and HSP70 mRNA expression. **Science of the Total Environment**, v. 718, p. 137326, 2020.

WAISMAN, Ari; LIBLAU, Roland S.; BECHER, Burkhard. Innate and adaptive immune responses in the CNS. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 9, p. 945-955, 2015.

WANG, Jing et al. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 10, p. 4709-4721, 2019.

WOLF, Jeffrey C. et al. Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers, and readers. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 3, p. 297-325, 2015.

WOLF, Jeffrey C.; WHEELER, James R. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. **Aquatic Toxicology**, v. 197, p. 60-78, 2018.

WOO, Seng-Ryong; CORRALES, Leticia; GAJEWSKI, Thomas F. Innate immune recognition of cancer. **Annual review of Immunology**, v. 33, p. 445-474, 2015.

WOOLLARD, A. C.; TATHAM, K. C.; BARKER, S. The influence of essential oils on the process of wound healing: a review of the current evidence. **Journal of Wound Care**, v. 16, n. 6, p. 255-257, 2007.

WU, Yunpeng; LUO, Yaguang; WANG, Qin. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **LWT-Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 283-290, 2012.

YAMASHITA, M. M. et al. Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1235-1243, 2017.

YANG, Dongyang; XU, Wei. Clustering on Human Microbiome Sequencing Data: A Distance-Based Unsupervised Learning Model. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1612, 2020.

YANISHLIEVA, Nedyalka V. et al. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 59-66, 1999.

YIGIT, Nalan Ozgur et al. Effect on histology and nutrient digestibility of supplemented *Origanum onites* essential oil to rainbow trout diets (*Oncorhynchus mykiss*). **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 51, n. 3, 2017.

YOSHIMURA, A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. **Cancer Science**, v. 97(6), p. 439-47, 2006.

ZEPPENFELD, C. C. et al. *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen*–Stress and antioxidant parameters. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1362-1367, 2017.

ZHANG, R. et al. Dietary oregano essential oil improved the immune response, activity of digestive enzymes, and intestinal microbiota of the koi carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 518, p. 734781, 2020.

ZHENG, Z. L. et al. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, n. 3-4, p. 214-218, 2009.

ZHONG, Qixin; JIN, Minfeng. Zein nanoparticles produced by liquid–liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2380-2387, 2009.