

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

José Francisco Valério Júnior

**RESPOSTA MORFO-ADAPTATIVA E ANTIOXIDANTE DE JUNDIÁ
(*Rhamdia quelen*) SUPLEMENTADOS COM NANOEMULSÃO DE
Cymbopogon flexuosus NA DIETA**

Santa Maria, RS

2023

José Francisco Valério Júnior

RESPOSTA MORFO-ADAPTATIVA E ANTIOXIDANTE DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) SUPLEMENTADOS COM NANOEMULSÃO DE *Cymbopogon flexuosus* NA DIETA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Zootecnia**.

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Teixeira da Costa

Coorientador: Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS

2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Valério Júnior, José Francisco
RESPOSTA MORFO-ADAPTATIVA E ANTIOXIDANTE DE JUNDIÁ
(Rhamdia quelen) SUPLEMENTADOS COM NANOEMULSÃO DE
Cymbopogon flexuosus NA DIETA / José Francisco Valério
Júnior.- 2023.
63 p.; 30 cm

Orientador: Sílvio Teixeira da Costa
Coorientador: Bernardo Baldisserotto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Zootecnia, RS, 2023

1. Células mucosas 2. Morfometria da pele e brânquias
3. Aditivo alimentar 4. Estresse oxidativo I. Teixeira
da Costa, Sílvio II. Baldisserotto, Bernardo III. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da usm. dados fornecidos pelo autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca central. bibliotecária responsável saula schoenfeldt vatta cma 10/1728.

Declaro, JOSÉ FRANCISCO VALÉRIO JÚNIOR, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

José Francisco Valério Júnior

**RESPOSTA MORFO-ADAPTATIVA E ANTIOXIDANTE DE JUNDIÁ
(*Rhamdia quelen*) SUPLEMENTADOS COM NANOEMULSÃO DE
Cymbopogon flexuosus NA DIETA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia: Produção animal.

Aprovado em 08 de fevereiro de 2023.

Sílvio Teixeira da Costa, Dr. (UFSM) – Videoconferência
(Presidente/Orientador)

Fernando Jonas Sutili, Dr. (ELOAQUA) – Videoconferência

Marcelo Leite da Veiga, Dr. (UFSM) – Videoconferência

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por permitir que eu tenha um objetivo e um sonho na vida.

A toda minha família, pai, mãe e irmãs, pelo amor, motivação e por sempre me incentivarem aos estudos.

Ao meu orientador, Sílvio Teixeira da Costa, pelas divertidas histórias e orientações no decorrer do mestrado. Agradecido pela oportunidade, sem o senhor, essa conquista não seria possível.

Ao Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto, que aceitou o desafio de me coorientar. Obrigado pelos ensinamentos e por sempre estar disposto a ajudar. Sem o senhor o mestrado não seria possível.

Aos membros da banca, Dr. Fernando Jonas Sutili e Dr. Marcelo Leite da Veiga que gentilmente aceitaram o convite. Grato pelas valiosas sugestões ao trabalho!

Aos Professores do programa de Pós-graduação, pela contribuição para minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Marcelo do departamento de morfologia da UFSM, que não mediu esforços em me ajudar. Grato pela contribuição ao trabalho!

Aos colegas de Pós-Graduação Cristian Camilo e Viviane Tavares pelo auxílio e amizade.

À família Vencato, em especial Telbio, Liane, Mabile e Gabriel. Grato pelos conselhos, ajuda e principalmente pelos dedos de prosa. Com vocês me senti acolhido!

A grande amiga Marina Vencato. Obrigado pelo apoio, conselhos e pelas longas e divertidas conversas sobre a vida.

A Isabela Zanoni Felipi, pela amizade, apoio, conversas e por sempre estar disposta a ajudar.

A colega de LABITEX Isabela Maraschin pelos ensinamentos durante as análises histológicas.

A todos os pesquisadores por suas contribuições que me possibilitaram realizar este trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por me possibilitar essa oportunidade.

Ao programa de Pós-Graduação em zootecnia-PPGZ/UFSM.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos, meu sincero muito obrigado!!!

EPÍGRAFE

“Quando estiver que escolher entre estar certo a ser gentil, escolha ser gentil”

(Kintuanje Pascoal)

RESUMO

RESPOSTA MORFO-ADAPTATIVA E ANTIOXIDANTE DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) SUPLEMENTADOS COM NANOEMULSÃO DE *Cymbopogon flexuosus* NA DIETA

AUTOR: José Francisco Valério Júnior

ORIENTADOR: Sílvio Teixeira da Costa

O efeito da nanoemulsão do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon flexuosus* na resposta morfo-adaptativa e seu potencial antioxidante em jundiá (*Rhamdia quelen*) naturalmente infectados por *Aeromonas hydrophila* foi estudado. Para isso, jundiás (n= 400) foram distribuídos aleatoriamente em sistema de recirculação de água constituído de 20 caixas de polipropileno, 20 peixes por caixa (4 repetições cada tratamento). Os tratamentos dietéticos foram constituídos de cinco dietas experimentais suplementadas com nanoemulsão do OECE na seguintes concentrações: 0; 0.25; 0.5; 1.0 e 2.0 mL/kg de ração. Durante vinte e um dias, os animais foram alimentados duas vezes ao dia (09:00 e 19:00 horas) e os parâmetros de qualidade da água, temperatura, oxigênio dissolvido, pH e amônia foram monitorados. Ao final do experimento, jundiás (n= 8), foram anestesiados e eutanasiados para coleta de material biológico. Amostras de fígado, brânquias e pele foram cuidadosamente coletadas para posteriores análises morfométricas e do estado oxidativo. As variáveis de qualidade da água mantiveram-se dentro da faixa considerada ideal para a espécie. Os resultados histomorfométricos de brânquias e pele demonstraram que os maiores níveis de nanoemulsão do OECE (1.0 e 2.0 mL/Kg de ração), não possuem efeito sobre a morfometria cutânea e branquial de jundiá naturalmente infectados por *A. hydrophila*. Porém, a suplementação dietética da nanoemulsão do OECE na concentração de 0.5 mL/kg de ração demonstrou efeito antioxidante nas brânquias de jundiás naturalmente infectados por *A. hydrophila*. Jundiás acometidos naturalmente por *A. hydrophila* apresentaram estruturas do parênquima hepático normal, indicando que a nanoemulsão de OECE possui efeito hepatoprotetor contra infecção. Deste modo, os efeitos benéficos observados neste estudo indicam o uso promissor da nanoemulsão do OECE na aquicultura.

Palavras-chave: Aditivo alimentar. Células mucosas. Estresse oxidativo. Morfometria da pele e brânquias.

ABSTRACT

MORPH-ADAPTIVE AND ANTIOXIDANT RESPONSE OF SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) SUPPLEMENTED WITH *Cymbopogon flexuosus* NANOEMULSION IN DIET

AUTHOR: José Francisco Valério Júnior

ADVISOR: Sílvio Teixeira da Costa

The effect of *Cymbopogon flexuosus* essential oil nanoemulsion on morpho-adaptive response and its antioxidant potential in silver catfish (*Rhamdia quelen*) naturally infected by *Aeromonas hydrophila* was studied. For this, silver catfish (n= 400) were randomly distributed in a water recirculation system consisting of 20 polypropylene boxes, 20 fish per box (4 replicates each treatment). Dietary treatments consisted of five experimental diets supplemented with OECF nanoemulsion at the following concentrations: 0; 0.25; 0.5; 1.0 and 2.0 mL/kg of feed. For Twenty-one days, the animals were fed twice a day (09:00 and 19:00 hours) and the parameters of water quality, temperature, dissolved oxygen, pH and ammonia were monitored. At the end of the experiment, silver catfish (n= 8) were anesthetized and euthanized to collect biological material. Liver, gill and skin samples were carefully collected for further morphometric and oxidative state analyses. The variables of water quality remained within the range considered ideal for the species. The histomorphometric results of gills and skin showed that the highest levels of nanoemulsion of OECF (1.0 and 2.0 mL/kg of feed) have no effect on skin and gill morphometry of silver catfish naturally infected by *A. hydrophila*. However, the dietary supplementation of OECF nanoemulsion at the concentration of 0.5 m/kg feed showed antioxidant effect on the gills of silver catfish naturally infected by *A. hydrophila*. Silver catfish naturally affected by *A. hydrophila* presented structures of the normal hepatic parenchyma, indicating that the nanoemulsion of OECF has a hepatoprotective effect against infection. Thus, the beneficial effects observed in this study indicate the promising use of OECF nanoemulsion in aquaculture.

Keywords: Food aditive. Mucous cells. Oxidative stress. Skin and gill morphometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

- Figura 1 - Exemplar de jundiá (*Rhamdia quelen*)11
- Figura 2 - Imagem de seção transversal da pele de jundiá (*Rhamdia quelen*) mostrando características morfológicas e tipos celulares da derme e epiderme14
- Figura 3 - Exemplar de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*)19

Manuscrito

- Figura 1 - Tamanho de células mucosas do filamento branquial (A), densidade de células mucosas do filamento branquial (B) e status de barreira das células mucosas do filamento branquial (C) de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) suplementados com nanoemulsão de OEFCF em diferentes concentrações. Os valores são expressos como a média \pm SEM ($n=8$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de nanoemulsão de OEFCF na dieta de *R. quelen*43
- Figura 2 - Fotomicrografia de brânquias de jundiá (*Rhamdia quelen*) infectados naturalmente por *A. hydrophila* alimentados com dietas contendo diferentes concentrações da nanoemulsão de OEFCF. Peixes não infectados e alimentados com a dieta controle (A); Peixes naturalmente infectados, alimentados com as dietas experimentais (0,25, 0,5, 1,0, 2,0 mL/kg de dieta) (B, C, D e E, respectivamente). Setas: células mucosas; setas de duas pontas: hiperplasia interlamelar. Coloração PAS e Alcian Blue. Barra de escala = 50 μ m. Aumento 20x44
- Figura 3 - Tamanho de células mucosas da pele (A), densidade de células mucosas da pele (B), status de barreira das células mucosas da pele (C) de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) suplementados com nanoemulsão de OEFCF em diferentes concentrações. Os valores são expressos como a média \pm SEM ($n=8$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de nanoemulsão de OEFCF na dieta de *R. quelen*45
- Figura 4 - Fotomicrografia de pele de jundiá (*Rhamdia quelen*) infectados naturalmente por *A. hydrophila* alimentados com dietas contendo diferentes concentrações da nanoemulsão de OEFCF. Peixes não infectados e alimentados com a dieta controle (A); Peixes naturalmente infectados, alimentados com as dietas experimentais (0,25, 0,5, 1,0, 2,0 mL/kg de dieta) (B, C, D e E, respectivamente). Setas: células mucosas. Coloração PAS e Alcian Blue. Barra de escala = 50 μ m. Aumento 20x46

Figura 5 - Substâncias reativas aos níveis de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (A), capacidade antioxidante total (TAC) (B), nas brânquias de juvenis de jundiá (*R. quelen*) suplementados com nanoemulsão de OEFC em diferentes concentrações. Os valores são expressos como a média \pm SEM ($n= 8$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de nanoemulsão de OEFC na dieta de *R. quelen* naturalmente infectados por *A. hydrophila*47

Figura 6 - Fotomicrografias comparativas de fígado de jundiá (*R. quelen*) alimentados com a dieta controle (A), e dietas experimentais suplementadas com diferentes níveis de nanoemulsão de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OEFC) (0,25, 0,5, 1,0, 2,0 mL/kg de dieta) (B, C, D e E, respectivamente). Coloração de Hematoxilina & Eosina (H & E). Barra de escala = 50 μ m. Aumento 40x48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EROS - Espécies reativas ao oxigênio

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

O₂^{•-} - Ânion radical superóxido

OE - Óleo essencial

OE_s - Óleos essenciais

OH - Radical hidroxila

pH - Potencial hidrogeniônico

TAC - Capacidade antioxidante total

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 CARACTERÍSTICAS DO JUNDIÁ	13
1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS	14
1.2.1 Células mucosas	14
1.2.2 Morfologia cutânea e branquial	16
1.3 ESPÉCIE BACTERIANA: <i>Aeromonas hydrophila</i>	18
1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS E SUA UTILIZAÇÃO NA AQUICULTURA	19
1.5 <i>CYMBOPOGON FLEXUOSUS</i>	21
1.6 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	22
REFERÊNCIAS	24
2 OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo geral.....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3 DESENVOLVIMENTO	42
3.1 MANUSCRITO.....	42
RESPOSTA MORFO-ADAPTATIVA E ANTIOXIDANTE DE JUNDIÁ (<i>RHAMDIA QUELEN</i>) SUPLEMENTADOS COM NANOEMULSÃO DE <i>CYMBOPOGON FLEXUOSUS</i> NA DIETA	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS DO JUNDIÁ

O jundiá, *Rhamdia quelen*, membro da família Heptapteridae (Figura 1) é um bagre nativo do Brasil com ampla distribuição geográfica, encontrado desde a região sul do México até a Argentina (NELSON; GRANDE; WILSON, 2016). Caracteriza-se por ter o corpo alongado, revestido por pele espessa, crânio achatado, boca ausente de dentes e coloração bastante variável, com o dorso geralmente cinza escuro e o ventre, mais claro (GOMES *et al.*, 2000).

De hábito alimentar onívoro com tendência a carnívoro, o jundiá alimenta-se de pequenos peixes, insetos, crustáceos, detritos orgânicos e restos vegetais (BROGGI *et al.*, 2017; JÚNIOR *et al.*, 2015). Devido ao seu comportamento bentônico, é comum encontrá-lo em regiões calmas e profundas dos rios, próximo às margens e à vegetação. Possuem hábito diurno (SCAGLIONE *et al.*, 2018) e quando adulto pode medir até 50 cm de comprimento total, e pesar de até 3kg (GOMES *et al.*, 2000).

Figura 1 - Espécime de jundiá (*Rhamdia quelen*)

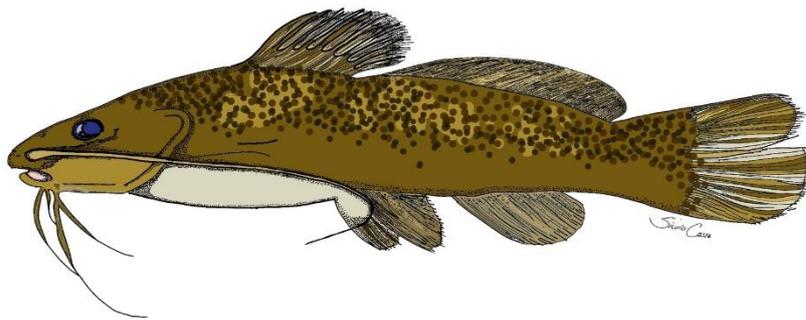


Imagem: Sílvia Teixeira da Costa

O cultivo de jundiá na região sul do Brasil desperta o interesse de produtores, visto que a espécie apresenta docilidade, aceita facilmente dietas artificiais, tem boa eficiência alimentar (FRACALOSSO *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2000) e rápido crescimento, podendo alcançar 600

a 800 gramas de peso em até oito meses de cultivo (BARCELLOS *et al.*, 2004). Além disso, por se tratar de uma espécie euritérmica, resiste a grande variação de temperatura (GOMES *et al.*, 2000). Por isso, se adequa ao cultivo em regiões de clima temperado ou subtropical (BARCELLOS *et al.*, 2001; SOSO *et al.*, 2007), tendo crescimento satisfatório mesmo durante as estações mais frias do ano (FRACALOSSO *et al.*, 2004).

Devido a sua capacidade de adaptação, o jundiá pode ser cultivado em diferentes sistemas de produção como tanques-rede (MARCELA *et al.*, 2011; MARTINELLI *et al.*, 2013), viveiro escavado (FRACALOSSO *et al.*, 2004; JUNIOR *et al.*, 2008), sistema de recirculação de água (SANTOS *et al.*, 2021) e bioflocos (BATTISTI *et al.*, 2020). Além disso, a espécie também tem sido cultivada em sistema de policultivo (DIAS *et al.*, 2021).

Quanto à comercialização, o jundiá apresenta excelentes características como bom rendimento de filé (34,75%) (CARNEIRO *et al.*, 2004), carne de coloração clara, macia e saborosa, sem espinhas intramusculares (FRACALOSSO *et al.*, 2004; SANTOS; MEURER, 2020). Por esse motivo, a espécie tem boa aceitação do mercado consumidor (SEBEN *et al.*, 2021), sendo sua carne muito apreciada no Brasil, Uruguai e Argentina (SALHI *et al.*, 2004). A pele de jundiá também pode ser utilizada como subproduto para extração de colágeno de alta qualidade e surge como alternativa para a indústria em substituição ao colágeno de mamíferos (SILVA *et al.*, 2021). Em virtude dessas características, o jundiá vem demonstrando grande potencial para produção pela aquicultura.

1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS

1.2.1 Células mucosas

Nos teleósteos, os epitélios cutâneo e branquial formam as barreiras epiteliais da mucosa que constituindo a primeira linha de defesa dos animais (GOMEZ; SUNYER; SALINAS, 2013). Esses tecidos são formados por um conjunto de células imunocompetentes, como células epiteliais, ionócitos, células mucosas e outros tipos celulares que compõem a complexidade da defesa imunológica (ESTEBAN, 2012). Em especial, as células mucosas têm sua origem na camada intermediária da epiderme, onde se desenvolvem. À medida que amadurecem, acumulam muco, aumentam de tamanho e passam a se localizar na superfície da epiderme onde o muco é secretado (YAMAMOTO; KAWAI; OSHIMA, 2011).

Nos peixes, as células mucosas dividem-se em três grupos: células de club, células saciformes e células caliciformes (DASH *et al.*, 2018). Em particular, as células caliciformes são as mais estudadas (ESTEBAN, 2012), podendo ser encontradas em todas as superfícies

epidérmicas dos peixes sendo responsáveis por produzir e secretar a maior parte do muco que compõem as barreiras epiteliais da mucosa (DASH *et al.*, 2018; ELLIOTT, 2011a). Além disso, as células mucosas (caliciformes) podem ser diferenciadas em células que secretam muco contendo mucinas ácidas e mucinas neutras, identificadas a partir de colorações histoquímicas específicas (CULLING; REID, 1979).

O muco é considerado um elemento-chave e representa a primeira resposta do sistema imunológico inato a situações adversas (ABOLFATHI *et al.*, 2022; CONE, 2009). Trata-se de um fluido protetor, viscoso, formado pela hidratação de mucinas, que atua como barreira física, protegendo os peixes de fatores externos, atritos e danos mecânicos (ALKAN; OĞUZ, 2022; GOMEZ; SUNYER; SALINAS, 2013). Em conjunto com as mucinas, uma complexa mistura de outros compostos biologicamente ativos como peptídeos antimicrobianos, enzimas proteolíticas, proteínas do complemento, lectinas, imunoglobulinas e lisozima, fornecem ao muco atividade protetora imediata contra agentes infecciosos (ABOLFATHI *et al.*, 2022; ESTEBAN, 2012; LAZADO; CAIPANG, 2014; SALINAS; ZHANG; SUNYER, 2011). Na aquicultura, a atividade antimicrobiana do muco foi demonstrada contra diferentes patógenos de peixes como *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* e *Saccharomyces cerevisiae* (BRAGADEESWARAN *et al.*, 2011; KUMARI; TYOR; BHATNAGAR, 2019; SHIBUYA; TSUTSUI; NAKAMURA, 2019).

As propriedades químicas e a fluidez do muco são muito importantes para a manutenção de suas funções imunológicas (LAI *et al.*, 2009). De modo geral, a espessura da barreira mucosa é determinada pelo equilíbrio entre a taxa de secreção e as taxas de degradação e excreção. No entanto, a composição e as características do muco podem variar de acordo com fatores endógenos (estádios de desenvolvimento e sexo) e exógenos (pH, temperatura da água, estresse e infecções) (ESTEBAN, 2012). Da mesma forma, a densidade de células mucosas pode sofrer variações sobre diferentes condições ambientais como alta concentração de amônia, presença de metais pesados, variações do pH, temperatura, salinidade da água e infecções (ALKAN; OĞUZ, 2022). Ainda, a densidade de células mucosas pode variar também de acordo com a região do corpo, estágio de crescimento e espécie (YAMAMOTO; KAWAI; OSHIMA, 2011).

Como visto anteriormente, tanto a composição do muco quanto a densidade de células são afetados por fatores bióticos e abióticos. Por esse motivo, diferentes autores sugeriram que o número de células mucosas pode ser utilizado como índice para monitorar o estresse dos peixes (ESTEBAN, 2012; VATSOS *et al.*, 2010). No entanto, poucos são os trabalhos que avaliaram a influência da nutrição em promover uma resposta positiva sobre os parâmetros da mucosa em peixes, em particular sobre a expressão de células mucosas.

1.2.2 Morfologia cutânea e branquial

As barreiras mucosas em peixes incluem pele e brânquias, que desempenham importantes funções (DOYLE *et al.*, 2022). Especificamente em peixes, a pele é um órgão que desempenha diferentes funções como percepção sensorial, regulação iônica, excreção e proteção (ELLIOTT, 2011b). É um tecido que cobre a superfície corporal dos peixes, separando-os do ambiente aquático, protegendo-os contra micro-organismos oportunistas (ZHANG *et al.*, 2023). No geral, sua estrutura é semelhante, no entanto, algumas características morfológicas podem ser observadas entre as diferentes espécies de peixes (GARG *et al.*, 2010).

A pele dos peixes (Figura 2) pode ser dividida em duas camadas. A camada interna, derme, e uma camada externa, epiderme, que diferem em estrutura e função. Resumidamente, a derme é um tecido de sustentação, que consiste sobretudo em uma estrutura fibrosa, com poucas células, tecido adiposo, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células pigmentares. Já a epiderme é constituída por um epitélio multicamadas, compostos principalmente por células especializadas, incluindo, células sensoriais, células epiteliais, células imunes e células mucosas (ELLIOTT, 2011b; ESTEBAN, 2012).

Figura 2 - Imagem de seção transversal da pele de jundiá (*Rhamdia quelen*) mostrando algumas das características morfológicas e tipos celulares da derme e epiderme.

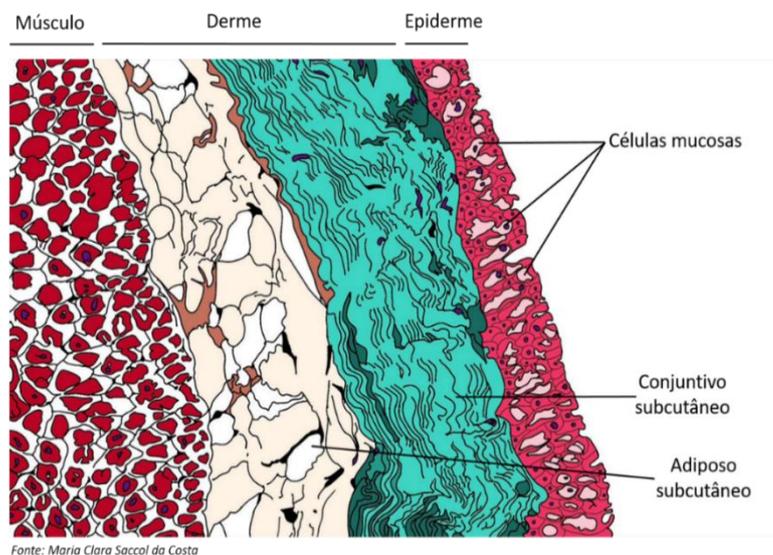


Imagem: Maria Clara Saccol da Costa

Nos peixes, diferentemente dos mamíferos, a presença de células mucosas na epiderme resulta na formação de uma camada mucosa na superfície dos animais que consiste na primeira

linha de defesa, formando uma barreira física, química e biológica (ESTEBAN; CERZUELA, 2015; YU *et al.*, 2020). Trata-se de uma barreira mucosa que possui função imunológica (SALINAS; ZHANG; SUNYER, 2011), responsável por impedir a entrada de organismos patogênicos como parasitas, fungos e bactérias (GUELLEC; MORVAN-DUBOIS; SIRE, 2004). Além disso, por ser uma barreira dinâmica o muco é continuamente secretado e substituído, o que impede a colonização da superfície dos peixes por potenciais agentes patogênicos (ESTEBAN; CERZUELA, 2015).

Depois da pele, as brânquias são um dos tecidos mais importantes da mucosa dos peixes (DANG *et al.*, 2020; LAZADO; CAIPANG, 2014). Morfologicamente, as brânquias apresentam quatro arcos pareados, cada um possuindo duas fileiras de filamentos orientados, com lamelas cobertas por epitélio com extensa área superficial (HAUGARVOLL *et al.*, 2008). É um órgão multifuncional que desempenha funções como respiração, excreção, regulação ácido-base, osmorregulação dentre outras (SHIH *et al.*, 2022; ZIMMER; PERRY, 2022).

Além das funções citadas anteriormente, as brânquias foram propostas também como um órgão imune, caracterizado por apresentar uma grande superfície mucosa (REBL *et al.*, 2014). Esta forma uma fina barreira responsável por proteger os animais do contato direto com o meio externo (DANG *et al.*, 2020) e possui propriedades antibacterianas e atuam como uma barreira química e biológica protegendo contra potenciais agentes infecciosos (HILL *et al.*, 2004). Por tudo isto, tem sido considerada muito importante para o bem-estar dos animais (WANG *et al.*, 2015).

As barreiras mucosas do epitélio cutâneo e branquial têm sido frequentemente estudadas porque os peixes estão expostos a grande variação de condições ambientais, como mudanças na qualidade da água, poluentes e a diferentes patógenos oportunistas que se desenvolvem no ambiente de cultivo (DANG *et al.*, 2020; NIMALAN *et al.*, 2022). Um número crescente de pesquisas que avaliaram a exposição de peixes a patógenos e a contaminantes químicos revelaram que a exposição a estes agentes estimula uma maior secreção de muco pelas células mucosas (DANG *et al.*, 2020; GUARDIOLA *et al.*, 2015). Conseqüentemente, o aumento da produção de muco fortalece as barreiras mucosas, aumentando sua espessura, retardando a difusão desses agentes, exercendo importante papel protetor para os peixes (CONE, 2009). Além disso, o muco consegue ligar-se a materiais orgânicos e inorgânicos removendo-os junto com o muco secretado para o meio ambiente (GUARDIOLA *et al.*, 2015). Assim, investigar o estado das barreiras mucosas pode ser uma importante ferramenta para avaliar a saúde dos peixes.

1.3 ESPÉCIE BACTERIANA: *Aeromonas hydrophila*

Os surtos de doenças bacterianas são um grande entrave ao desenvolvimento da indústria aquícola. Dentre as principais bactérias, pode-se destacar a *Aeromonas hydrophila*, como sendo responsável por causar doenças e conseqüentemente perdas econômicas aos piscicultores.

Aeromonas hydrophila é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família *Aeromonadaceae* e gênero *Aeromonas* (JANDA; ABBOTT, 2010). É um patógeno bacteriano, oportunista, associado a infecções secundárias, que pode ser encontrado em diferentes ambientes aquáticos (água salobra, água doce, marinha e estações de abastecimento de água), especialmente durante as estações mais quentes (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2009; ZHANG; XU; SHOEMAKER, 2016). Ainda, podem ser encontradas em solos naturais, pássaros, carnes e em outros produtos alimentícios que tiverem contato com a água (JANDA; ABBOTT, 2010).

A. hydrophila é uma espécie altamente virulenta que tem causado alta mortalidade em diferentes espécies de peixes como bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (ZHANG; XU; SHOEMAKER, 2016), carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) (SUN *et al.*, 2022) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (YOUNIS *et al.*, 2023). Normalmente os surtos estão relacionados a mudanças ambientais (variações do pH, temperatura e salinidade da água) e estresse (manejo e infecções parasitárias) (BARCELLOS *et al.*, 2008). Peixes infectados por *A. hydrophila* normalmente apresentam hemorragias, ascite, úlcera septicêmica na pele e padrão de natação anormal (JANDA; ABBOTT, 2010; KARI *et al.*, 2022).

Além desses sintomas, foi relatado que a infecção causada por *A. hydrophila* pode afetar órgãos como as brânquias, provocando deslocamento das células epiteliais, congestão e hiperplasia interlamelar. Danos no fígado como hemorragia, edema celular em hepatócitos, congestão dos capilares sinusóides e desorganização nas estruturas do tecido hepático também são causados pela infecção bacteriana (MARINHO-NETO *et al.*, 2019).

Historicamente, os piscicultores têm utilizado antibióticos na prevenção e tratamento de doenças bacterianas em espécies aquícolas. No entanto, o uso indevido e indiscriminado dos antibióticos resultou no aumento de cepas resistentes de bactérias patogênicas e na bioacumulação de resíduos antimicrobianos em produtos aquícolas e no meio ambiente (LEE *et al.*, 2016; ROMERO; GLORIA; NAVARRETE, 2012). Por isso, desde 2006 o uso de antibióticos no tratamento de doenças de peixes tem sido desaconselhado pela União Europeia, dessa forma, os piscicultores têm procurado novas estratégias para o tratamento dos animais (JANELIDZE *et al.*, 2022).

Na busca por alternativas aos antibióticos, várias pesquisas revelam o potencial de produtos naturais para inibir agentes patogênicos em peixes (KARI *et al.*, 2022). Em particular, óleos essenciais provenientes de plantas medicinais mostram-se uma alternativa promissora contra a infecção de *A. hydrophila* em peixes (MONTEIRO *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2016; SUTILI *et al.*, 2015; ZHONG *et al.*, 2022).

1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS E SUA UTILIZAÇÃO NA AQUICULTURA

A utilização de produtos naturais na aquicultura tem sido extensamente documentada na literatura (CUESTA; ESTEBAN; MESEGUER, 2002; DAWOOD *et al.*, 2022). Mais especificamente, o uso de plantas e seus derivados têm ganhado destaque e surgem como substitutos aos produtos sintéticos, uma vez, considerados alternativas mais sustentáveis, segura, com baixa toxicidade, de baixo custo e acessíveis aos produtores (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; HEO, 2011; REVERTER *et al.*, 2020; ZHU, 2020). Nesse contexto, óleos essenciais (OEs) provenientes de plantas medicinais vêm sendo utilizados com sucesso no cultivo de peixes.

Óleos essenciais são misturas complexas de baixa massa molecular, sintetizadas pelas plantas para fins de defesa e sinalização, que contêm substâncias formadas a partir do seu metabolismo secundário (SHARIFI-RAD *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2019). De modo geral, podem ser obtidos de matéria-prima vegetal (casca, fruto, folhas, sementes e raízes) e serem extraídos por meio de diferentes métodos, tais como hidro difusão, pressão ou destilação a vapor (REGNAULT; VINCENT; ARNASON, 2012; SOUZA *et al.*, 2019). São compostos aromáticos, altamente concentrados, que apresentam grande variedade de grupos funcionais (MANION; WIDDER, 2017; NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010).

Quimicamente, os óleos essenciais são constituídos de uma grande variedade de componentes que podem variar em termos de natureza e número (ASGARPANAH; SARABIAN; ZIARATI, 2014; SILVA *et al.*, 2020). Em geral, os OEs podem conter mais de 100 compostos diferentes em sua composição química (ASBAHANI *et al.*, 2015; BAKKALI *et al.*, 2008). Normalmente, são formados principalmente por terpenos (hidrocarbonetos) e terpenoides (hidrocarbonetos contendo oxigênio), sendo os primeiros mais predominantes (BAKKALI *et al.*, 2008; SHARIFI-RAD *et al.*, 2017). Em função de seus principais constituintes bioativos, os OEs possuem extenso espectro de atividades biológicas (ASBAHANI *et al.*, 2015). Por esse motivo, são conhecidos por suas propriedades

antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas, antiparasitárias, entre outras (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

Devido a suas inúmeras propriedades biológicas, na aquicultura os OEs têm sido utilizados no combate e inibição de patógenos de peixes, como *A. hydrophila*, *Saprolegnia sp.* (BENAVIDES *et al.*, 2021; NARDONI *et al.*, 2019; ÖZDEMIR; TAŞTAN; GÜNEY, 2022), *Piscinoodinium pillulare* e *Ichthyophthirius multifiliis* (DAWOOD *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2019; VALLADÃO *et al.*, 2016). Ainda, os OEs de *Origanum vulgare*, *Salvia rosmarinus* e *Minthostachus mollis* demonstraram efeito contra monogenéticos *Anacanthorus penilabiatus*, *Anacanthorus spathulatus* e *Mymarothecium viatorum* das brânquias de *Piaractus brachypomus* (GONZALES *et al.*, 2022).

Os OEs também são utilizados como anestésicos e sedativos para peixes, por exemplo, os OEs de *Melissa officinalis*, *Mentha piperita* e *Lippia alba* demonstraram forte efeito anestésico e surgem como alternativas naturais aos anestésicos sintéticos (BRANDÃO *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2022). Além disso, os OEs de *Melissa officinalis*, *Myrcia sylvatica* e *Nectandra grandiflora*, foram eficientes em reduzir o estresse em diferentes espécies de peixes (BARBAS *et al.*, 2020; SACCOL *et al.*, 2018; WANG; MEI; XIE, 2022).

Na nutrição, OE de orégano (*Origanum vulgare*) pode ser utilizado como aditivo alimentar, pois melhorou o desempenho de crescimento em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (MAGOUZ *et al.*, 2022; SHOURBELA *et al.*, 2021), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (DINARDO *et al.*, 2020) e carpa comum (*Cyprinus carpio*) (ACAR *et al.*, 2021). A suplementação dietética com OE de tomilho (*Thymus vulgaris*) melhorou a imunidade inata e o estado oxidativo de carpa comum (*Cyprinus carpio*) e truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (GHAFARIFARSANI *et al.*, 2022; YOUSEFI *et al.*, 2022). Também foram demonstrados resultados positivos da suplementação dietética dos OEs de *Lippia sidoides*, *Petroselinum crispum* e *Panax ginseng* sobre a morfologia intestinal (altura e largura de vilosidade) e enzimas digestivas, indispensáveis à absorção e ao crescimento em *Colossoma macropomum* e *O. niloticus* (AHMED *et al.*, 2022; COPATTI *et al.*, 2022; FARAG *et al.*, 2022).

Apesar dos bons resultados, algumas características podem limitar o uso dos OEs nas pisciculturas (volatilidade, sensibilidade à luz e baixa solubilidade em água). Conseqüentemente, eles podem se degradar facilmente (por oxidação, volatilização, aquecimento, luz) se não forem protegidos de fatores externos (AK; A, 2010). Por esse motivo, faz-se necessário a adoção de tecnologias que permitam maior proteção aos OEs contra esses fatores. Neste sentido, a nanoemulsão representa uma alternativa viável como mecanismo de proteção contra a instabilidade e decomposição do OE (FLORES *et al.*, 2011).

As nanoemulsões são sistemas nanoestruturados (tamanho de partícula reduzido (100-200nm), amplamente utilizados na indústria farmacêutica, pois aumentam a biodisponibilidade e a permeabilidade por meio de barreiras biológicas, mantendo a liberação controlada do fármaco e protegendo-o contra mecanismos de degradação (DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2007). Por essa razão, a nanoemulsão de OEs tem sido estudada em modelos *in vitro* e *in vivo*, rendendo vários resultados positivos (BACCEGA *et al.*, 2021; GÜNDEL *et al.*, 2018, 2020; ÖZIL; DILER; NAZIROĞLU, 2022).

1.5 CYMBOPOGON FLEXUOSUS

O capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* (Steud) Wats) (Figura 3), é uma espécie originária da Índia Oriental, pertencente à família Poaceae e gênero *Cymbopogon* (AVOSEH *et al.*, 2015). É uma planta herbácea, aromática e perene, utilizada pela medicina tradicional de forma muito variada, como medicamento para o tratamento de problemas no estômago, febre e alívio da dor (KUMAR *et al.*, 2021). A espécie possui também propriedades clínicas e farmacológicas interessantes, sendo por esse motivo amplamente utilizada em cosméticos, perfumaria, aplicações terapêuticas, conservação de alimentos e agricultura (AVOSEH *et al.*, 2015; HAQUE; REMADEVI; NAEBE, 2018). Por essa razão, tem sido cultivada comercialmente em diferentes países (RAO *et al.*, 2015), principalmente, devido ao grande interesse no uso de seu OE, comercialmente valioso (SHARMA *et al.*, 2009).

Figura 3 – Exemplar de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*)



Fonte: (GANJEWALA *et al.*, 2013)

C. flexuosus produz óleo de textura fluida com coloração amarela e fragrância agradável de limão (KUMAR *et al.*, 2021), tendo como seu principal constituinte o monoterpene citral (3,7-dimetil 2,6-octadienal) (AVOSEH *et al.*, 2015). Biologicamente, o OE de *C. flexuosus* possui alta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Enterococcus* spp e *Aeromonas* spp (ADUKWU; ALLEN; PHILLIPS, 2012; GAO *et al.*, 2020; QUENDERA; BARRETO; SEMEDO-LEMSADDEK, 2019) e também exibiu atividades antifúngicas contra *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium oryzae* (DEVI *et al.*, 2021). Além disso, o uso de nanoemulsões contendo OE de *C. flexuosus* se mostrou uma alternativa promissora no tratamento de candidíase vulvovaginal “*in vivo*” (GÜNDEL *et al.*, 2020).

Em se tratando de peixes, o OE de *C. flexuosus* demonstrou melhorar o desempenho produtivo de jundiá (*Rhamdia quelen*) (BALDISSEROTTO *et al.* 2015). O OE de *C. flexuosus* também foi eficaz para promover a sedação e anestesia de juvenis de tambacu (*Piaractus mesopotamicus* macho x *Colossoma macropomum* fêmea) (LIMMA-NETTO; SENA; COPATTI, 2016), induziu à anestesia e sedação de juvenis de jundiá (SANTOS *et al.*, 2017) e apresentou atividade antibacteriana “*in vitro*” contra cepas de bactérias patogênicas de peixes, *Streptococcus iniae*, *Photobacterium damsela* e *Lactococcus garviae*, isoladas de linguado cultivado (*Paralichthys olivaceus*) (PATHIRANA *et al.*, 2019).

A suplementação de OE de *C. flexuosus* microencapsulado na dieta não provocou alterações nos parâmetros reprodutivos, expressão de gens na hipófise e estado oxidativo nos testículos de reprodutores machos de jundiá (SOUZA *et al.*, 2018b). Em recente pesquisa, seu uso microencapsulado como aditivo alimentar não afetou a composição centesimal e a composição de ácidos graxos em filés de jundiá durante armazenamento congelado (RAMPELOTTO *et al.*, 2021). Ainda, segundo os mesmos autores, não foram detectados constituintes do OE de *C. flexuosus* nos filés dos peixes, indicando que o OE de *C. flexuosus* é seguro e pode ser utilizado na aquicultura para fins de consumo humano.

1.6 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

De forma simplificada, o estresse oxidativo é originado pela diferença entre os radicais livres produzidos e a atividade antioxidante. Esse desequilíbrio resulta na produção excessiva de oxigênio e conseqüente formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs) (BIRNIE-GAUVIN *et al.*, 2017; YANG; LIM; SONG, 2020). Assim, se as EROs produzidas ultrapassam a capacidade do organismo de eliminar essas espécies reativas com uso do sistema antioxidante, ocorre o estresse oxidativo, provocando danos oxidativos aos constituintes celulares (LUSHCHAK, 2016).

As principais EROs formadas são os radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), e hidroxila (OH), sendo esse último, quimicamente, mais prejudicial (LUSHCHAK, 2011). Outro produto gerado é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Mesmo não sendo um agente oxidante, pode ser convertido em radical hidroxila, altamente reativo (BARBOSA *et al.*, 2010; BIRNIE-GAUVIN *et al.*, 2017). Para prevenir a formação desses radicais, os organismos contam com um importante sistema antioxidante formado por fatores enzimáticos como catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase, dentre outros e/ou não enzimáticos, como por exemplo carotenoides, ácido ascórbico (vitamina C) e glutathione reduzida (HOSEINIFAR *et al.*, 2020; LUSHCHAK, 2016).

No momento que o sistema antioxidante se torna insuficiente, ocorrem modificações nas proteínas celulares, DNA e lipídios. Em particular, os lipídios são oxidados através da formação de peróxidos gerando produtos tóxicos, sendo esse processo denominado de peroxidação lipídica (LUSHCHAK, 2011; VALAVANIDIS *et al.*, 2006). A peroxidação lipídica é uma abordagem popular, comumente utilizada para medir os efeitos provocados por EROs em diversos organismos (LUSHCHAK, 2016), sobretudo os aquáticos por conterem quantidades elevadas de lipídios com resíduos de ácidos graxos poli-insaturados, um substrato para a oxidação (LUSHCHAK, 2011). Para monitorar a peroxidação lipídica, a metodologia frequentemente utilizada baseia-se na avaliação dos níveis de malonaldeído (MDA). Neste ensaio, é avaliada a reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), para formar substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (HU; ZHONG, 2010; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

A atividade oxidante pode ser estimada pela medição de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos individualmente. Além disso, comumente pode-se avaliar a capacidade antioxidante total (TAC). A TAC pode ser entendida como a capacidade de um composto de reduzir ou neutralizar pró-oxidantes (GHISELLI *et al.*, 2000; RUBIO *et al.*, 2016) e foi desenvolvida para avaliar as atividades cumulativas, sinérgicas e protetoras de todos os antioxidantes presentes em uma amostra (PRIOR, 2015). Análises de TAC têm sido amplamente utilizadas em fluidos biológicos, extratos vegetais, plantas medicinais e alimentos (FERRARI; FERRARI, 2011).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATIF, H. M. R.; KHAFAGA, A. F. Natural co-infection of cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* with *Aeromonas hydrophila* and *Gyrodactylus cichlidarum* experiencing high mortality during summer. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 5, p. 1880–1892, 2020.
- ABOLFATHI, M. *et al.* Seasonal variations in the skin epidermal structure and mucosal immune parameters of rainbow trout skin (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of farming. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 127, n. June, p. 965–974, 2022.
- ACAR, Ü. *et al.* Effects of essential oil derived from the bitter orange (*Citrus aurantium*) on growth performance, histology and gene expression levels in common carp juveniles (*Cyprinus carpio*). **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1–12, 2021.
- ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1217–1227, 2012.
- AHMED, M. M. *et al.* Dietary Supplementation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) With *Panax ginseng* Essential Oil: Positive Impact on Animal Health and Productive Performance, and Mitigating Effects on Atrazine- Induced Toxicity. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, n. June, p. 1–16, 2022.
- AK, T.; A, M. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 2010.
- ALKAN, Z.; OĞUZ, A. R. Investigation of some hormones affecting osmoregulation of Lake Van fish (*Alburnus tarichi*) during reproductive migration. **Aquaculture Research**, v. 53, n. 3, p. 1011–1018, 2022.
- ALLAN, B. J.; STEVENSON, R. M. W. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 27, n. 10, p. 1114–1122, 1981.
- ALYAHYA, S. A. *et al.* Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 182–185, 2018.
- AMADO, L. L. *et al.* A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals

in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 2115–2123, 2009.

ASBAHANI, A. EL *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

ASGARPANA, J.; SARABIAN, S.; ZIARATI, P. Essential oil of *Nepeta genus* (Lamiaceae) from Iran: A review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 1, p. 1–12, 2014.

AVOSEH, O. *et al.* *Cymbopogon* Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7438–7453, 2015.

AYDIN, B.; BARBAS, L. A. L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. **Aquaculture**, v. 520, n. October, p. 734999, 2020.

BACCEGA, B. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activity of the essential oil and nanoemulsion of *Cymbopogon flexuosus* against *Trichomonas gallinae*. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 11, n. 1, p. 32–43, 2021.

BACHIEGA, T. F.; SFORCIN, J. M. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 909–913, 2011.

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

BALDISSERA, M. D. *et al.* *Melaleuca alternifolia* essential oil enhances the non-specific immune system and prevents oxidative damage in *Rhamdia quelen* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*: Effects on cholinergic and purinergic systems in liver tissue. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 61, n. 2, p. 1–8, 2017.

BALDISSERA, M. D. *et al.* The disturbance of antioxidant/oxidant balance in fish experimentally infected by *Aeromonas caviae*: Relationship with disease pathophysiology. **Microbial Pathogenesis**, v. 122, n. June, p. 53–57, 2018.

BANDEIRA-JUNIOR, G. *et al.* The Use of Cinnamon Essential Oils in Aquaculture: Antibacterial, Anesthetic, Growth-Promoting, and Antioxidant Effects. **Fishes**, v. 7, n. 3, p. 1–15, 2022.

BANDEIRA JUNIOR, G. *et al.* Combined effect of florfenicol with linalool via bath in combating *Aeromonas hydrophila* infection in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture**,

v. 545, n. July, p. 1–12, 2021.

BANDEIRA JUNIOR, G.; BALDISSEROTTO, B. Fish infections associated with the genus *Aeromonas*: a review of the effects on oxidative status. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 3, p. 1083–1101, 2020.

BARBAS, L. A. L. *et al.* Stress relieving potential of two plant-based sedatives in the transport of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 520, n. September 2019, 2020.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARCELLOS, J. L. G. *et al.* *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **B. Inst. Pesca, São Paulo**, v. 34, n. 3, p. 355–363, 2008.

BARCELLOS, L. J. G. *et al.* Steroid profiles in cultured female jundiá, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces teleostei), during the first reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 121, n. 3, p. 325–332, 2001.

BARCELLOS, L. J. G. *et al.* Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: Cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v. 232, n. 1–4, p. 383–394, 2004.

BATTISTI, E. K. *et al.* Effect of stocking density on growth, hematological and biochemical parameters and antioxidant status of silver catfish (*Rhamdia quelen*) cultured in a biofloc system. **Aquaculture**, v. 524, p. 1–6, 2020.

BENAVIDES, S. *et al.* Thyme essential oil loaded microspheres for fish fungal infection: microstructure, *in vitro* dynamic release and antifungal activity. **Journal of Microencapsulation**, v. 38, n. 1, p. 11–21, 2021.

BIRNIE-GAUVIN, K. *et al.* A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 5, p. 928–942, 2017.

BRAGADEESWARAN, S. *et al.* Antimicrobial and hemolytic activity of fish epidermal mucus *Cynoglossus arel* and *Arius caelatus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 4, p. 305–309, 2011.

BRANDÃO, F. R. *et al.* Anesthetic potential of the essential oils of *Aloysia triphylla*, *Lippia*

sidoides and *Mentha piperita* for *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 534, n. 6, p. 1–8, 2021.

BROGGI, J. A. *et al.* Hidrolisado proteico de resíduo de sardinha como atrativo alimentar para juvenis de jundiá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 2, p. 505–512, 2017.

CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 29, n. 3, p. 219–224, 1997.

CARNEIRO, P. C. F. *et al.* PROCESSAMENTO DO JUNDIÁ *Rhamdia quelen*: RENDIMENTO DE CARCAÇA. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, v. 2, n. 3, p. 11–17, 2004.

CHEN, N. *et al.* Histopathological analysis and the immune related gene expression profiles of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 83, n. June, p. 410–415, 2018.

CONE, R. A. Barrier properties of mucus ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 2, p. 75–85, 2009.

COPATTI, C. E. *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**, v. 560, n. 2, p. 1–7, 2022.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 89, n. 3–4, p. 169–174, 2002.

CULLING, C. F.; REID, P. E. The Histochemistry of Colonic Mucins. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 1177–1179, 1979.

CUNHA, M. A. DA *et al.* Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet.pdf. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2107–2114, 2010.

DANG, M. *et al.* Mucous cell responses to contaminants and parasites in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*) from a former lead-zinc mine in West Greenland. **Science of the Total Environment**, v. 678, n. April, p. 207–216, 2019.

DANG, M. *et al.* Histological mucous cell quantification and mucosal mapping reveal different aspects of mucous cell responses in gills and skin of shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 100, n. January, p. 334–344, 2020.

DASH, S. *et al.* Epidermal mucus, a major determinant in fish health: A review. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 19, n. 2, p. 72–81, 2018.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* Antiparasitic and antibacterial functionality of essential oils: An alternative approach for sustainable aquaculture. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1–38, 2021.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* Exploring the Roles of Dietary Herbal Essential Oils in Aquaculture: A Review. **Animals**, v. 12, n. 7, p. 823, 2022.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2547–2565, 2007.

DEVI, M. A. *et al.* Antifungal activity and volatile organic compounds analysis of essential oils from *Cymbopogon species* using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 3, n. March 2021, p. 1–6, 2021.

DIAS, P. DA S. *et al.* Policultivo de tilápia do Nilo, jundiá e curimba em tanque de PVC em estufa. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 2, p. 1572–1581, 2021.

DINARDO, F. R. *et al.* Effect of feed supplementation with *Origanum vulgare* L. essential oil on sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A preliminary framework on metabolic status and growth performances. **Aquaculture Reports**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2020.

DINARDO, F. R. *et al.* A multi-biomarker approach in european sea bass exposed to dynamic temperature changes under dietary supplementation with *Origanum vulgare* essential oil. **Animals**, v. 11, n. 4, p. 1–18, 2021.

DONG, H. T. *et al.* *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 10, p. 1395–1403, 2017.

DOYLE, D. *et al.* Transport and Barrier Functions in Rainbow Trout Trunk Skin Are Regulated by Environmental Salinity. **Frontiers in Physiology**, v. 13, n. May, p. 1–14, 2022.

- ELLIOTT, D. G. The skin | Functional Morphology of the Integumentary System in Fishes. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2011a. v. 1p. 476–488.
- ELLIOTT, D. G. The skin | The Many Functions of Fish Integument. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2011b. v. 1p. 476–488.
- ESTEBAN, M. Á. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. **ISRN Immunology**, v. 2012, n. 2, p. 1–29, 2012.
- ESTEBAN, M. Á.; CERZUELA, R. Fish mucosal immunity: skin - Mucosal Health in Aquaculture. In: **Mucosal Health in Aquaculture**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 67–92.
- FARAG, M. R. *et al.* Effect of parsley essential oil on digestive enzymes, intestinal morphometry, blood chemistry and stress-related genes in liver of Nile tilapia fish exposed to Bifenthrin. **Aquaculture**, v. 546, n. 2, p. 1–9, 2022.
- FERRARI, G. S. L.; FERRARI, C. K. B. Exercise modulation of total antioxidant capacity (TAC): Towards a molecular signature of healthy aging. **Frontiers in Life Science**, v. 5, n. 3–4, p. 81–90, 2011.
- FERREIRA, L. C. *et al.* Antiparasitic activity of *Mentha piperita* (Lamiaceae) essential oil against *Piscinoodinium pillulare* and its physiological effects on *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Aquaculture**, v. 512, n. July, p. 1–7, 2019.
- FLORES, F. C. *et al.* Nanostructured systems containing an essential oil: Protection against volatilization. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 968–972, 2011.
- FRACALOSSO, D. M. *et al.* Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 3, p. 345–352, 2004.
- GAO, S. *et al.* Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (*Cymbopogon flexuosus*) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* Species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–14, 2020.
- GARG, T. K. *et al.* Histochemistry and functional organization of the dorsal skin of *Ancistrus dolichopterus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 4, p. 877–884, 2010.

- GHAJARIFARSANI, H. *et al.* Effects of dietary vitamin C, thyme essential oil, and quercetin on the immunological and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 553, n. 2, p. 1–10, 2022.
- GHISELLI, A. *et al.* Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 11, p. 1106–1114, 2000.
- GOMES, L. DE C. *et al.* Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000.
- GOMEZ, D.; SUNYER, J. O.; SALINAS, I. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1729–1739, 2013.
- GONZALES, A. F. *et al.* In vitro efficacy and tolerance of the essential oils of three species of the Lamiaceae family against monogeneans from the gills of *Piaractus brachipomus* from the Peruvian Amazon. **Aquaculture International**, v. 30, n. 5, p. 2245–2261, 2022.
- GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5319–5341, 2012.
- GUARDIOLA, F. A. *et al.* Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 45, n. 1, p. 112–123, 2015.
- GUELLEC, D. LE; MORVAN-DUBOIS, G.; SIRE, J. Y. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 2–3, p. 217–231, 2004.
- GÜNDEL, S. DA S. *et al.* Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, n. 4, p. 268–276, 2018.
- GÜNDEL, S. DA S. *et al.* In vivo antifungal activity of nanoemulsions containing eucalyptus or lemongrass essential oils in murine model of vulvovaginal candidiasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 1–5, 2020.
- HAQUE, A. N. M. A.; REMADEVI, R.; NAEBE, M. Lemongrass (*Cymbopogon*): a review on its structure, properties, applications and recent developments. **Cellulose**, v. 25, n. 10, p. 5455–

5477, 2018.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture**, v. 317, n. 1–4, p. 1–15, 2011.

HAUGARVOLL, E. *et al.* Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. **Journal of Anatomy**, v. 213, n. 2, p. 202–209, 2008.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271–280, 1995.

HILL, W. G. *et al.* Permeabilities of teleost and elasmobranch gill apical membranes: Evidence that lipid bilayers alone do not account for barrier function. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 287, n. 1 56-1, p. 235–242, 2004.

HOSEINIFAR, S. H. *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 29, n. 2, p. 198–217, 2020.

HU, Z.; ZHONG, Q. Determination of thiobarbituric acid reactive substances in microencapsulated products. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 794–799, 2010.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–73, 2010.

JANELIDZE, N. *et al.* Phenotypic and Genetic Characterization of *Aeromonas hydrophila* Phage AhMtk13a and Evaluation of Its Therapeutic Potential on Simulated *Aeromonas* Infection in *Danio rerio*. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 1–33, 2022.

JIRAVANICHPAISAL, P. *et al.* A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 1, p. 56–66, 2009.

JUNIOR, H. A. *et al.* Avaliação do jundiá (*Rhamdia quelen*) em diferentes sistemas de cultivo para a região do litoral centro norte de Santa Catarina, Brasil. **Revista Eletronica de Veterinaria**, v. 9, n. 12, p. 1–7, 2008.

JÚNIOR, H. A. *et al.* **Assim cultivamos o Jundiá *Rhamdia quelen* no estado de Santa Catarina**. 1. ed. Camboriú - SC: REPENSA/CNPQ/FAPESC, REDEJUNDIÁ -, 2015.

KARI, Z. A. *et al.* Role of phytobiotics in relieving the impacts of *Aeromonas hydrophila* infection on aquatic animals : A mini-review. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, n. 5, p. 1–11, 2022.

KUMAR, S. *et al.* Organic source on productivity of pomegranate–lemongrass-based agroforestry system in central India. **Agroforestry Systems**, v. 95, n. 4, p. 615–624, 2021.

KUMARI, S.; TYOR, A. K.; BHATNAGAR, A. Evaluation of the antibacterial activity of skin mucus of three carp species. **International Aquatic Research**, v. 11, n. 3, p. 225–239, 2019.

LAI, S. K. *et al.* Micro- and macrorheology of mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 2, p. 86–100, 2009.

LAZADO, C. C. *et al.* Morphomolecular alterations in the skin mucosa of Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to peracetic acid-based disinfectant. **Aquaculture Reports**, v. 17, n. February, p. 100368, 2020.

LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A. Mucosal immunity and probiotics in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 39, n. 1, p. 78–89, 2014.

LEDY, K.; GIAMBÉRINI, L.; PIHAN, J. C. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta* fario in acidic, aluminium-containing stream water. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 56, n. 3, p. 235–240, 2003.

LEE, S. W. *et al.* Peperomia pellucida leaf extract as immunostimulator in controlling motile aeromonad septicemia due to *Aeromonas hydrophila* in red hybrid tilapia, *Oreochromis* spp. farming. **Veterinary World**, v. 9, n. 3, p. 231–234, 2016.

LIMA, C. L. *et al.* Eugenol and *Lippia alba* essential oils as effective anesthetics for the Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon wallacei* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 2101–2120, 2021.

LIMMA-NETTO, J. D.; SENA, A. C.; COPATTI, C. E. Essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the sedation, anesthesia and recovery of tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* Female). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, p. 727–733, 2016.

LING, Q. *et al.* Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of Citral-Rich Chemotype *Cinnamomum camphora* and *Cinnamomum bodinieri*. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7356, 2022.

LU, W. C. *et al.* Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 82–89, 2018.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011.

LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 711–747, 2016.

MAGOUZ, F. I. *et al.* The effects of dietary oregano essential oil on the growth performance, intestinal health, immune, and antioxidative responses of Nile tilapia under acute heat stress. **Aquaculture**, v. 548, n. 1, p. 1–8, 2022.

MANION, C. R.; WIDDER, R. M. Essentials of essential oils. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 74, n. 9, p. 153–162, 2017.

MARCELA, J. *et al.* Proteína e energia na dieta de jundiás criados em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 12, p. 2628–2633, 2011.

MARINHO-NETO, F. A. *et al.* Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–20, 2019.

MARTINELLI, S. G. *et al.* Densidade de estocagem e frequência alimentar no cultivo de jundiá em tanques-rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 871–877, 2013.

MONTEIRO, P. C. *et al.* Short-term baths with essential oils of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* influence blood parameters and survival of tambaqui (*Colossoma macropomum*) after infection with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 53, n. 1, p. 265–275, 2022.

MOUSAVI, S. *et al.* Changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth and mucosal immune parameters after dietary administration of grape (*Vitis vinifera*) seed extract. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 547–563, 2021.

- NARDONI, S. *et al.* *In Vitro* Activity of Essential Oils against *Saprolegnia parasitica*. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1–8, 2019.
- NELSON, S. J.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **FISHES OF THE WORD**. 5. ed. New Jersey: Wiley, 2016.
- NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 372–378, 2010.
- NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, v. 302, n. 2, p. 71–83, 2010.
- NIMALAN, N. *et al.* Mucosal barrier status in Atlantic salmon fed marine or plant-based diets supplemented with probiotics. **Aquaculture**, v. 547, n. June, p. 1–19, 2022.
- ÖZDEMİR, R. C.; TAŞTAN, Y.; GÜNEY, K. Prevention of *Saprolegniasis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs using oregano (*Origanum onites*) and laurel (*Laurus nobilis*) essential oils. **Journal of Fish Diseases**, v. 45, n. 1, p. 51–58, 2022.
- ÖZIL, Ö.; DILER, Ö.; NAZIROĞLU, M. Antifungal activity of some essential oil nanoemulsions against *Saprolegniasis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs: Antifungal activity of essential oil nanoemulsions. **Aquaculture International**, v. 30, n. 5, p. 2201–2212, 2022.
- PATHIRANA, H. N. K. S. *et al.* Determination of the in vitro effect of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) oil against fish pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Slovenian Veterinary Research**, v. 56, n. 3, p. 125–131, 2019.
- PITTMAN, K. *et al.* Novel method for quantifying salmonid mucous cells. **Journal of Fish Diseases**, v. 34, n. 12, p. 931–936, 2011.
- PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 18, n. 4, p. 797–810, 2015.
- QUENDERA, A. P.; BARRETO, A. S.; SEMEDO-LEMSADDEK, T. Antimicrobial activity of essential oils against foodborne multidrug-resistant enterococci and aeromonads in planktonic and biofilm state. **Food Science and Technology International**, v. 25, n. 2, p. 101–

108, 2019.

RAMPELOTTO, C. *et al.* Microencapsulated Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) Essential Oil Supplementation on Quality and Stability of Silver Catfish Fillets during Frozen Storage. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 30, n. 9, p. 1124–1141, 2021.

RAO, B. R. R. *et al.* Essential oil profiles of different parts of East Indian lemongrass { *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) Wats. }. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 3, p. 225–231, 2015.

REBL, A. *et al.* Transcriptome Profiling Reveals Insight into Distinct Immune Responses to *Aeromonas salmonicida* in Gill of Two Rainbow Trout Strains. **Marine Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 333–348, 2014.

REGNAULT, C. R.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405–424, 2012.

REVERTER, M. *et al.* Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2020.

RIBEIRO, S. C. *et al.* Antioxidants effects and resistance against pathogens of *Colossoma macropomum* (Serassalmidae) fed *Mentha piperita* essential oil. **Aquaculture**, v. 490, n. October 2017, p. 29–34, 2018.

ROMERO, J.; GLORIA, C.; NAVARRETE, P. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. In: **Health and Environment in Aquaculture**. [s.l: s.n.]. p. 160–198.

RUBIO, C. P. *et al.* Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: An update. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2016.

SACCOL, E. M. H. *et al.* *Myrcia sylvatica* essential oil in the diet of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) attenuates the stress response induced by high stocking density. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 5, p. 1381–1392, 2018.

SADDIQ, A. A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, n. 1, p. 89–93, 2010.

SALHI, M. *et al.* Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. **Aquaculture**, v. 231, n. 1–

4, p. 435–444, 2004.

SALINAS, I.; ZHANG, Y. A.; SUNYER, J. O. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1346–1365, 2011.

SANTOS, A. C. DOS *et al.* Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 44, n. 1, p. 106–113, 2017.

SANTOS, H. K. DOS *et al.* Crescimento e Biologia de alevinos de jundiá (*Rhamdia Quelen*) em um sistema de criação em recirculação de água.pdf. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 32827–32848, 2021.

SANTOS, H. K. DOS; MEURER, F. Nutrition and Feeding Aspects for Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 1, p. 299–309, 2020.

SCAGLIONE, M. C. *et al.* Light and dark rations and the photic entrainment of circadian locomotor activity patterns in the south american silver catfish (*Rhamdia quelen*, quoy & gaimard, 1824). **Biological Rhythm Research**, v. 49, n. 1, p. 129–140, 2018.

SEBEN, D. *et al.* Acute Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) Exposure to Chlorantraniliprole Insecticide. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 107, n. 5, p. 883–888, 2021.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1–55, 2017.

SHARMA, P. R. *et al.* Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, n. 2–3, p. 160–168, 2009.

SHIBUYA, K.; TSUTSUI, S.; NAKAMURA, O. Fugu, *Takifugu ruberipes*, mucus keratins act as defense molecules against fungi. **Molecular Immunology**, v. 116, n. September, p. 1–10, 2019.

SHIH, S. *et al.* *In Vivo* Functional Assay in Fish Gills : Exploring Branchial Acid-Excreting Mechanisms in Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 4419, p. 1–12, 2022.

SHOURBELA, R. M. *et al.* Oregano essential oil enhanced the growth performance , immunity , and antioxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems.

Aquaculture, v. 542, n. 1, p. 1–8, 2021.

SILVA, C. G. DA *et al.* Jundiá Fish Skin (*Rhamdia quelen*): An Unexplored By-product with Great Potential to Be Used as a Novel Source of Collagen. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 30, n. 8, p. 1002–1016, 2021.

SILVA, S. B. *et al.* The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 4, p. 279–295, 2020.

SOSO, A. B. *et al.* Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 308–313, 2007.

SOUZA, C. D. F. *et al.* Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish : a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiol Biochem**, v. 44, n. 2, p. 21–34, 2018a.

SOUZA, C. D. F. *et al.* Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A review. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 6, p. 1–17, 2019.

SOUZA, C. DE F. *et al.* Effects of dietary microencapsulated *Cymbopogon flexuosus* essential oil on reproductive-related parameters in male *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 1253–1264, 2018b.

SOUZA, C. F. *et al.* *In vivo* bactericidal effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil against *Aeromonas hydrophila*: Silver catfish (*Rhamdia quelen*) as an experimental model. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, n. 3, p. 82–87, 2016.

SOUZA, E. M. DE *et al.* Chemical composition and evaluation of the antimicrobial activity of two essential oils. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 2, p. 44–47, 2018c.

SOUZA, E. M. DE *et al.* *Cymbopogon flexuosus* essential oil as an additive improves growth, biochemical and physiological responses and survival against *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 1, p. 1–12, 2020.

SUN, B. Y. *et al.* Increased susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in grass carp with antibiotic-induced intestinal dysbiosis. **Aquaculture**, v. 552, n. 1, p. 737969, 2022.

SUTILI, F. J. *et al.* Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: In vitro activity and their use in experimentally infected fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 47–54,

2015.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. 1231–1249, 2014.

VALAVANIDIS, A. *et al.* Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178–189, 2006.

VALENTI, W. C. *et al.* Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 1–18, 2021.

VALLADÃO, G. M. R. *et al.* Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. **Journal of fish diseases**, v. 39, n. 10, p. 1143–1152, 2016.

VAN DYK, J. C.; COCHRANE, M. J.; WAGENAAR, G. M. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. **Chemosphere**, v. 87, n. 4, p. 301–311, 2012.

VATSOS, I. N. *et al.* Monitoring stress in fish by applying image analysis to their skin mucous cells. **European Journal of Histochemistry**, v. 54, n. 2, p. 107–111, 2010.

WANG, B. *et al.* Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF- κ B, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: Preventive role of arginine. **Aquatic Toxicology**, v. 158, n. 2, p. 125–137, 2015.

WANG, L. N. *et al.* Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on non-specific immune responses, oxidative status and liver histology of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture**, v. 426–427, p. 41–48, 2014.

WANG, Q. *et al.* Effects of *Melissa officinalis* L. Essential oil in Comparison with Anaesthetics on Gill Tissue Damage, Liver Metabolism and Immune Parameters in Sea Bass (*Lateolabrax maculatus*) during Simulated Live Transport. **Biology**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2022.

WANG, Q.; MEI, J.; XIE, J. The Effects of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Essential Oil on the Stress Response, Anti-Oxidative Ability, and Kidney Metabolism of Sea Bass during Live Transport. **Animals**, v. 12, n. 3, 2022.

WANG, S. T. *et al.* Biological parameters, immune enzymes, and histological alterations in the

- livers of grass carp infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 70, n. August, p. 121–128, 2017.
- YAMAMOTO, T.; KAWAI, K.; OSHIMA, S. Distribution of mucous cells on the body surface of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Journal of Fish Biology**, v. 78, n. 3, p. 848–859, 2011.
- YAN, S. *et al.* Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 54–60, 2015.
- YANG, C.; LIM, W.; SONG, G. Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 234, n. March, p. 1–11, 2020.
- YOUNIS, N. A. *et al.* *Cyathocotylidae* spp and motile aeromonads co-infections in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) causing mass mortality. **Microbial Pathogenesis**, v. 174, n. November 2022, p. 105897, 2023.
- YOUSEFI, M. *et al.* Effects of dietary thyme essential oil and prebiotic administration on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) welfare and performance. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 120, n. 2, p. 737–744, 2022.
- YU, Y. *et al.* Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. October, p. 1–14, 2020.
- ZEPPENFELD, C. C. *et al.* Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*).pdf. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 933–940, 2016.
- ZHANG, D.; XU, D. H.; SHOEMAKER, C. Experimental induction of motile *Aeromonas* septicemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by waterborne challenge with virulent *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reports**, v. 3, n. 2, p. 18–23, 2016.
- ZHANG, R. *et al.* Povidone iodine exposure alters the immune response and microbiota of the gill and skin in koi carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 563, n. 1, p. 1–11, 2023.
- ZHENG, T. *et al.* Transport Stress Induces Skin Innate Immunity Response in Hybrid Yellow Catfish (*Tachysurus fulvidraco*♀ × *P. vachellii*♂) Through TLR/NLR Signaling Pathways and Regulation of Mucus Secretion. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1–14, 2021.
- ZHONG, W. *et al.* Essential Oils From *Citrus unshiu* Marc. Effectively Kill *Aeromonas*

hydrophila by Destroying Cell Membrane Integrity, Influencing Cell Potential, and Leaking Intracellular Substances. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 1–12, 2022.

ZHU, F. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. **Aquaculture**, v. 526, n. 13, p. 1–7, 2020.

ZIMMER, A. M.; PERRY, S. F. Physiology and aquaculture: A review of ion and acid-base regulation by the gills of fishes. **Fish and Fisheries**, v. 23, n. 4, p. 874–898, 2022.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da nanoemulsão do óleo essencial de *C. flexuosus* na resposta adaptativa e antioxidante de jundiás (*Rhamdia quelen*) naturalmente infectados por *Aeromonas hydrophila*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar se a adição da nanoemulsão de óleo essencial de *C. flexuosus* na ração para jundiás infectados naturalmente por *Aeromonas hydrophila* é eficiente na proliferação de células mucosas cutâneas e branquiais;

- Verificar se a adição da nanoemulsão do óleo essencial de *C. flexuosus* na nutrição reflete na melhora do estado antioxidante do tecido branquial de jundiá naturalmente infectado por *Aeromonas hydrophila*.

- Investigar se a adição da nanoemulsão do óleo essencial de *C. flexuosus* na ração promove alguma adaptação morfológica do parênquima hepático de juvenis de jundiá naturalmente infectados por *Aeromonas hydrophila*.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 MANUSCRITO

RESPOSTA MORFO-ADAPTATIVA E ANTIOXIDANTE DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)
SUPLEMENTADOS COM NANOEMULSÃO DE *Cymbopogon flexuosus* NA DIETA

Resposta morfo-adaptativa e antioxidante de jundiá (*Rhamdia quelen*) suplementados com nanoemulsão de *Cymbopogon flexuosus* na dieta

Resumo: Este estudo avaliou a suplementação dietética da nanoemulsão do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OECF) na resposta morfo-adaptativa cutânea e branquial, assim como seu potencial antioxidante para juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), naturalmente infectados por *Aeromonas hydrophila*. Quatrocentos juvenis de jundiá ($7,60 \pm 3,29$ g; $10,01 \pm 1,40$ cm) foram distribuídos aleatoriamente em 20 caixas de polietileno (60 L), 20 peixes por caixa. Os animais foram alimentados com dietas suplementadas com a nanoemulsão do OECF nas concentrações de 0, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mL/ kg de dieta por vinte e um dias. O desenho experimental resultou em cinco tratamentos e quatro repetições. Ao final do período experimental, amostras de revestimento branquial, cutâneo e do fígado foram coletadas para análises morfométricas e do estado oxidativo. Nossos resultados mostraram que as maiores concentrações da nanoemulsão de OECF, com 1,0 e 2,0 mL/kg na suplementação dietética, não exercem efeito de preservação estrutural na morfometria branquial e cutânea dos jundiás infectados naturalmente pela *A. hydrophila*. No entanto, a suplementação dietética de 0,5 mL/kg da nanoemulsão do OECF por 21 dias demonstrou efeito antioxidante, uma vez que diminuiu as concentrações de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e aumentou a capacidade antioxidante total nas brânquias de jundiás naturalmente infectados por *A. hydrophila*. Além disso, a suplementação da nanoemulsão do OECF na dieta mostrou efeito hepatoprotetor em juvenis de jundiá infectados naturalmente por *A. hydrophila*. Assim, devido a esses efeitos benéficos, a nanoemulsão do OECF demonstra uso promissor na aquicultura.

Palavras-chave: Aditivo alimentar. Células mucosas. Estresse oxidativo. Morfometria cutânea e branquial.

INTRODUÇÃO

Aeromonas hydrophila é um agente infeccioso altamente patogênico que causa lesões em diferentes órgãos dos peixes, provocando alta mortalidade na aquicultura (SUN *et al.*, 2022; YOUNIS *et al.*, 2023). Brânquias e pele geralmente são os primeiros órgãos acometidos por aeromonose por constituírem a primeira linha de defesa da barreira mucosa e, por estarem constantemente expostos ao meio externo (DOYLE *et al.*, 2022). Por isso, danos no epitélio cutâneo e branquial, alterações nas células mucosas e no fígado são comumente associados à infecção por *A. hydrophila* (ABDEL-LATIF; KHAFAGA, 2020; ESTEBAN, 2012; MARINHO-NETO *et al.*, 2019)

A infecção por *A. hydrophila* também pode afetar o mecanismo de defesa dos peixes promovendo o estresse oxidativo devido à produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROs) ou eliminação ineficiente dos radicais livres (BALDISSERA *et al.*, 2017), comprometendo o sistema antioxidante dos animais. O acúmulo das EROs pode resultar no aumento dos níveis de malondialdeído (MDA), e provocar a peroxidação lipídica, resultando em danos oxidativos aos constituintes celulares (LUSHCHAK, 2016). Altas concentrações de malondialdeído em tecidos de peixes também têm sido relacionada à infecção por aeromonose (BANDEIRA JUNIOR; BALDISSEROTTO, 2020).

Apesar dos efeitos deletérios, foi relatado que a utilização de ingredientes naturais a base de plantas adicionados à dieta pode melhorar a estrutura da barreira mucosa em peixes acometidos por doenças bacterianas (MOUSAVI *et al.*, 2021). Uma barreira mucosa saudável com adequado número de células mucosas é vital para a manutenção das funções de defesa contra agentes invasores (PITTMAN *et al.*, 2011). Do mesmo modo, a abordagem nutricional com a utilização de compostos derivados de plantas medicinais demonstrou melhorar o sistema antioxidante de peixes, inibindo os danos provocados pelo estresse oxidativo, reduzindo os níveis de malondialdeído (MDA) em animais infectados por bactérias patogênicas (BANDEIRA-JUNIOR *et al.*, 2022). Assim, abordagens nutricionais mostram-se eficientes.

Os óleos essenciais de plantas medicinais (OEs), são utilizados em diferentes campos da aquicultura. Quando adicionado à dieta, os OEs demonstraram melhorar o status antioxidante, imunidade inata e a resistência de diferentes espécies de peixes a doenças infecciosas (DAWOOD *et al.*, 2021). O capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) é uma planta originária da Índia Oriental muito utilizada pela medicina tradicional (KUMAR *et al.*, 2021). Seu OE possui inúmeras propriedades farmacológicas (DEVI *et al.*, 2021; GAO *et al.*, 2020). Na aquicultura demonstrou induzir anestesia e sedação em jundiá (SANTOS *et al.*, 2017) e

apresentou atividade antibacteriana “*in vitro*” contra cepas de bactérias patogênicas de peixes (PATHIRANA *et al.*, 2019).

De modo geral, os OEs são compostos voláteis, sensíveis à luz e com baixa solubilidade em água, o que pode dificultar sua utilização nas pisciculturas. Logo, podem se degradar facilmente (por oxidação, volatilização, aquecimento), se não forem protegidos de fatores externos. Uma forma de proteger os OEs contra mecanismos de degradação, pode ser a formulação com nanoemulsões, visto que são sistemas nanoestruturados (partículas de tamanho reduzido 100-200nm) que vem sendo utilizados com sucesso pela indústria farmacêutica, pois aumentam a biodisponibilidade do fármaco mantendo sua liberação controlada (DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2007). Dessa forma, a nanoemulsão representa uma alternativa viável como mecanismo de proteção do OE contra a instabilidade e decomposição (FLORES *et al.*, 2011) e tem sido estudada em modelos *in vitro* e *in vivo*, rendendo vários resultados positivos contra agentes infecciosos (BACCEGA *et al.*, 2021; GÜNDEL *et al.*, 2018, 2020; ÖZIL; DILER; NAZIROĞLU, 2022). No entanto, a suplementação dietética da nanoemulsão do OEFC na aquicultura ainda não foi estudada.

O jundiá (*Rhamdia quelen*), é uma espécie nativa de grande importância econômica para a aquicultura da região sul do Brasil (VALENTI *et al.*, 2021). Contudo, a espécie é suscetível à infecção por *Aeromonas hydrophila*, o que pode causar grandes perdas econômicas aos piscicultores. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da suplementação dietética da nanoemulsão do OEFC na resposta morfo-adaptativa e anti-oxidante de juvenis de jundiá infectados naturalmente por *A. hydrophila*.

MATERIAL E METÓDOS

Obtenção e composição do óleo essencial

O OE de *Cymbopogon flexuosus* utilizado neste estudo foi adquirido comercialmente junto à empresa FERQUIMA Indústria e Comercio Ltda. Sua caracterização completa está disponível em GÜNDEL *et al.*, (2018).

Preparo da nano emulsão

A nano emulsão foi preparada pelo método de homogeneização sob alta agitação, composta por duas fases: A fase oleosa, contendo 5% de OE de *C. flexuosus* e 2% de monoelato de sorbitano, e uma fase aquosa, constituída por 2% de polissorbato e água ultrapura, segundo protocolo desenvolvido por Gündel *et al.*, (2018).

Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas de acordo com Zeppenfeld *et al.*, (2016). Os tratamentos dietéticos foram: 0,0 (dieta controle), 0,25, 0,5, 1,0, e 2,0 mL de nanoemulsão de OE de *C. flexuosus* por quilograma de dieta. A dieta controle foi preparada com 2,0 mL/kg de nanoemulsão sem adição de OE de *C. flexuosus*. Os ingredientes de cada dieta experimental foram pesados e manualmente homogeneizados. A nanoemulsão foi diluída em óleo de canola e adicionada à dieta. Em seguida, a dieta foi umedecida (água em temperatura ambiente), peletizada e depois seca a 40 °C em estufa de circulação forçada de ar por 24h. Após a secagem as rações foram embaladas em sacos plásticos e armazenadas a -18°C.

Animais

O Estudo atendeu as normas brasileiras de cuidado e uso de animais para fins Científicos e Educacionais protocolado sob o CEUA N° 6899161121. Juvenis de jundiá adquiridos de um produtor local (Santa Maria- RS, Brasil), foram transportados para o Laboratório de Fisiologia de Peixes – LAFIPE, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brasil, e aclimatados durante sete dias às condições experimentais. Após aclimação, foram mensurados o comprimento (cm) e o peso (g) individual de cada animal. Para isso, os peixes foram anestesiados em solução de eugenol 50 mg/L (CUNHA *et al.*, 2010).

Quatrocentos juvenis de jundiá ($7,60 \pm 3,29$ g; $10,01 \pm 1,40$ cm) foram distribuídos aleatoriamente em vinte caixas de polipropileno, com capacidade de 60 L, 20 peixes por caixa, em sistema de recirculação de água e aeração individual constante. Duas vezes ao dia (9:00 e 19:00 h), os animais foram alimentados com as dietas experimentais (4% da biomassa total), durante vinte e um dias. Diariamente, para remoção de sobras de alimento e fezes, foi realizada a limpeza das caixas por sifonagem, 30 minutos após a última alimentação. O desenho experimental resultou em cinco tratamentos e quatro repetições.

Durante o período experimental foram registradas mortalidades diárias. Lesões de pele, nadadeira, barbilhões e hemorragia foram os sinais mais observados em peixes mortos e moribundos. Dois peixes em estado moribundo que apresentavam esses sinais foram coletados para investigações suplementares. Um exame bacteriológico foi realizado no Laboratório de Bacteriologia (LABAC – UFSM), pelo método de cultura microbiológica em aerobiose. O resultado da análise identificou a presença de *Aeromonas hydrophila*.

O registro de infecção natural por *A. hydrophila*, contaminando os peixes de todas as unidades experimentais, resultou na completa perda dos animais do grupo controle. Uma segunda etapa experimental foi conduzida posteriormente. Um sistema à parte como referência

– grupo controle (dieta sem OEFC) e não contaminado por *A. hydrophila*, permitiu a comparação morfológica e bioquímica com os grupos infectados.

Material biológico

Ao final do experimento, oito peixes de cada tratamento foram anestesiados com eugenol 50 mg/L (CUNHA *et al.*, 2010) e eutanasiados por secção da medula para coleta de material biológico. Em seguida, amostras de fígado, revestimento cutâneo (região ventral) e brânquias (segundo arco branquial) foram cuidadosamente coletados, armazenadas em tubos estéreis e fixados em formalina tamponada 10% para posterior processamento histológico.

Histomorfometria

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Morfofisiologia Experimental (LABITEX), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras de tecido foram submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Os blocos foram seccionados na espessura de 6 µm em micrótomo rotativo (Easy path[®]).

Amostras de fígado foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). A análise morfológica do parênquima hepático foi realizada pelo método qualitativo. Para análise das células secretoras de muco do revestimento cutâneo e branquial as lâminas foram coradas utilizando a técnica de PAS e Alcian Blue (ZHENG *et al.*, 2021). Em seguida, as lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio modelo (Axio Scope.A1), equipado com sistema de captura de imagem AxioCam 105 color (ZEISS®, Germany) interfaceado ao software ZEN. Dez fotomicrografias de cada secção do epitélio cutâneo e do segundo arco branquial foram analisadas em software ImageJ v. 1.49. As análises de tamanho médio de células mucosas, número de células mucosas e densidade volumétrica no epitélio branquial e cutâneo foram calculados segundo (DANG *et al.*, 2020) e resultaram em três índices de mucosa:

A área de células mucosas: foi o tamanho médio das células mucosas no tecido dos indivíduos;

$$\text{Densidade de células mucosas: } \frac{\text{área de células mucosas} \times \text{número de células mucosas}}{\text{área do epitélio}} \times 100$$

$$\text{Status de barreira: } \frac{1}{(\text{área de células mucosas}/\text{densidade de células mucosas})} \times 1000$$

Marcadores de status oxidativo

Ao final do experimento, amostras do segundo arco branquial foram armazenadas em frascos Eppendorff[®] e mantidas em refrigeração – 80°C. Posteriormente, a capacidade antioxidante total (TAC) foi determinada de acordo com protocolo desenvolvido por Campos e Lissi. (1997). A absorbância foi registrada a 734 nm por 1 minuto. A peroxidação lipídica foi avaliada medindo a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (HERMES-LIMA; WILLMORE; STOREY, 1995), sendo a absorbância medida a 532 nm. Os valores de TAC e os níveis de TBARS são expressos como nmol/mg de proteína.

Análise da qualidade de água

Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados diariamente. A temperatura e o oxigênio dissolvido foram verificados com auxílio de oxímetro (YSI 50[®], Yellow Springs, OH, EUA). O pH da água foi monitorado com um pHmetro DMPH-2 (Digimed, São Paulo, Brasil). A concentração de amônia total foi monitorada usando kits colorimétricos comerciais (LabconTest, Alcon[®], Camburiú, Brasil). Os dados obtidos foram respectivamente: temperatura ($23,2 \pm 2,24$ °C), oxigênio dissolvido ($4,6 \pm 1,31$ mg/L⁻¹), pH ($7,2 \pm 0,44$), amônia total ($0,025 \pm 0,04$). As variáveis de qualidade da água permaneceram na faixa ideal para a espécie (GOMES *et al.*, 2000).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada em software GraphPad Prism[®] versão 8.0. A homogeneidade de variâncias foi analisada pelo teste de Levene. Para análise dos marcadores de estresse oxidativo foi utilizado ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Tukey. Os valores de tamanho de células, densidade de células e estado de barreira do epitélio branquial e cutâneo foram comparados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparação de médias. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0.05$. Os valores foram expressos como a média \pm SEM.

RESULTADOS

Morfometria branquial

Peixes alimentados com 0,5 mL/kg de nanoemulsão de OECF tiveram em média células mucosas brânquias ($66,47 \mu\text{m}^2$) significativamente maiores ($p < 0,05$) em comparação com os animais do grupo controle e alimentados com 0,25 e 2,0 mL/kg de nanoemulsão de OECF ($51,13 \mu\text{m}^2$, $46,50 \mu\text{m}^2$ e $42,35 \mu\text{m}^2$ respectivamente) (Fig. 1A). No entanto, não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no tamanho das células mucosas entre os animais alimentados com 0,5 e 1,0 mL/kg de nanoemulsão de OECF ($66,47 \mu\text{m}^2$ e $54,74 \mu\text{m}^2$ respectivamente). A densidade celular (Fig. 1B) foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais alimentados com 0,5 e 2,0 mL/kg de nanoemulsão de OECF em comparação com o grupo alimentado com 0,25 mL/kg de nanoemulsão OECF. O status de barreira mucosa (Fig. 1C) não foi afetado significativamente pelos tratamentos ($p > 0,05$). As brânquias de jundiás do grupo controle não infectado e dos animais alimentados com 0,25 e 0,5 mL/kg de nanoemulsão de OECF apresentaram estrutura normal (Fig. 2A - C). No entanto, foi observada hiperplasia interlamelar nas brânquias dos animais dos grupos alimentados com 1,0 e 2,0 mL/kg de nanoemulsão de OECF na dieta (Fig. 2D - E).

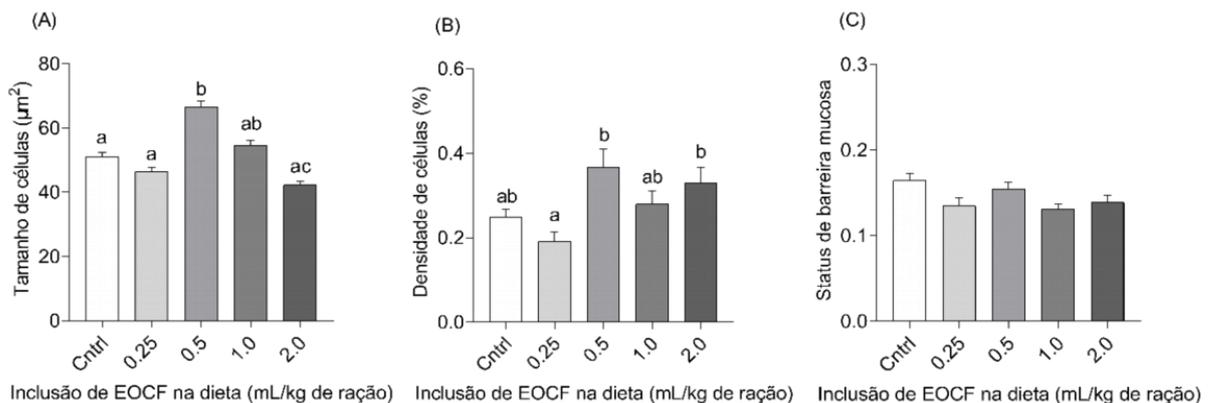


Figura 1: Tamanho de células mucosas do filamento branquial (A), densidade de células mucosas do filamento branquial (B) e status de barreira das células mucosas do filamento branquial (C) de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) suplementados com nanoemulsão de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OECF) em diferentes doses. Cntrl: controle (dieta sem OECF) não infectado. Os valores são expressos como a média \pm SEM ($n = 8$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos.

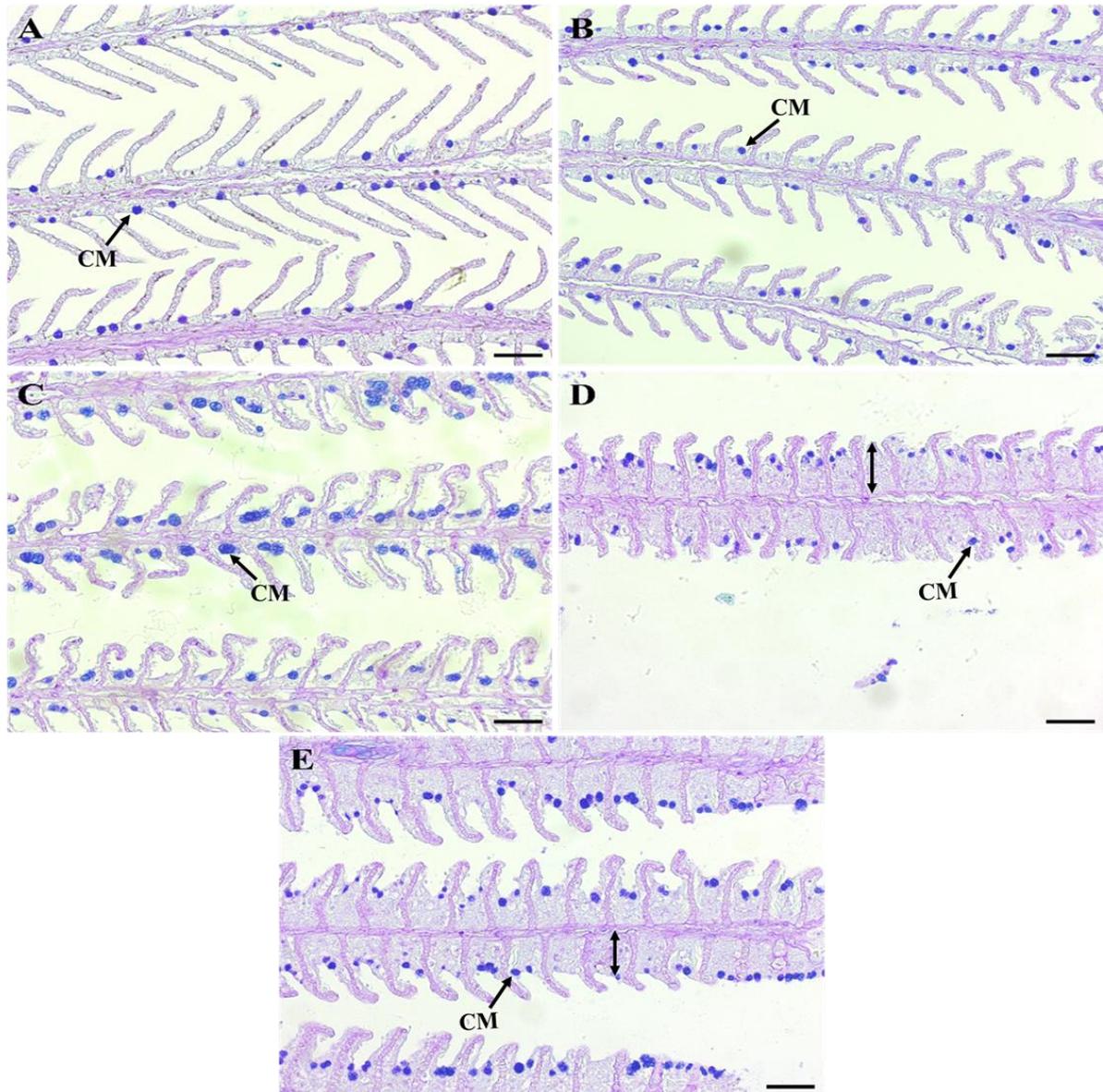


Figura 2: Fotomicrografias de brânquias de jundiá (*Rhamdia quelen*) infectados naturalmente por *A. hydrophila* alimentados com dietas contendo diferentes doses da nanoemulsão de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OECF). Peixes alimentados com a dieta controle (Cntrl: dieta sem OECF) não infectados (A); Peixes naturalmente infectados, alimentados com as dietas experimentais (0,25, 0,5, 1,0, 2,0 mL OECF/kg de dieta) (B, C, D e E, respectivamente). Setas: células mucosas; setas de duas pontas: hiperplasia interlamelar. Coloração PAS e Alcian Blue. Barra de escala = 50 μ m. Aumento 20x.

Morfometria cutânea

O tamanho médio das células mucosas da pele de juvenis de jundiá alimentados com 0,5 e 2,0 mL/kg de nanoemulsão de OECF na ração (62,36 μm^2 e 64,94 μm^2) foi significativamente menor ($p < 0,05$) que os dos animais alimentados com a dieta controle e não infectados (0) e os com 0,25 e 1,0 mL/kg de nanoemulsão de OECF na dieta (105,37 μm^2 , 113,58 μm^2 e 89,69 μm^2 respectivamente) (Fig. 3A). A densidade de células mucosas não foi afetada significativamente pelos tratamentos ($p > 0,05$) (Fig. 3B). Não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no status de barreira da pele dos animais alimentados com as dietas experimentais (Fig. 3C).

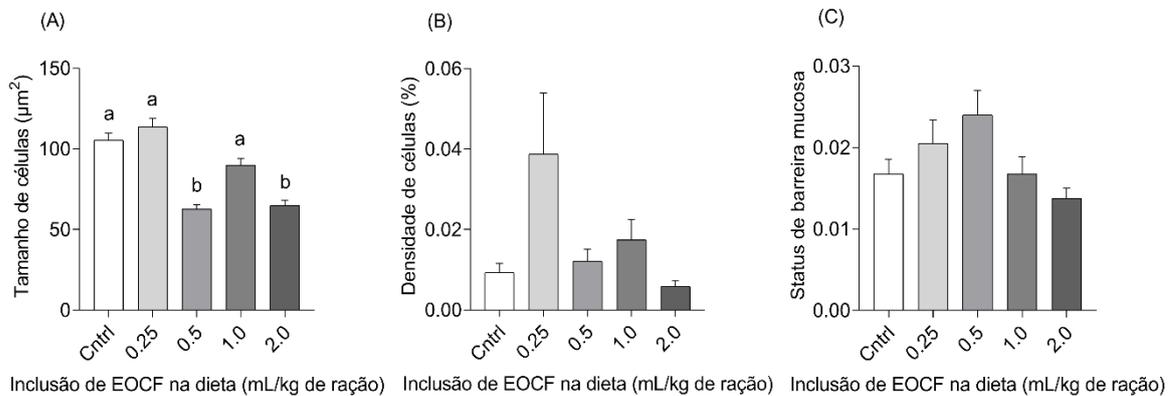


Figure 3: Tamanho de células mucosas da pele (A), densidade de células mucosas da pele (B) e status de barreira das células mucosas da pele (C) de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) suplementados com nanoemulsão de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OECF) em diferentes doses. Cntrl: controle (dieta sem OECF) não infectado. Os valores são expressos como a média \pm SEM ($n = 8$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos.

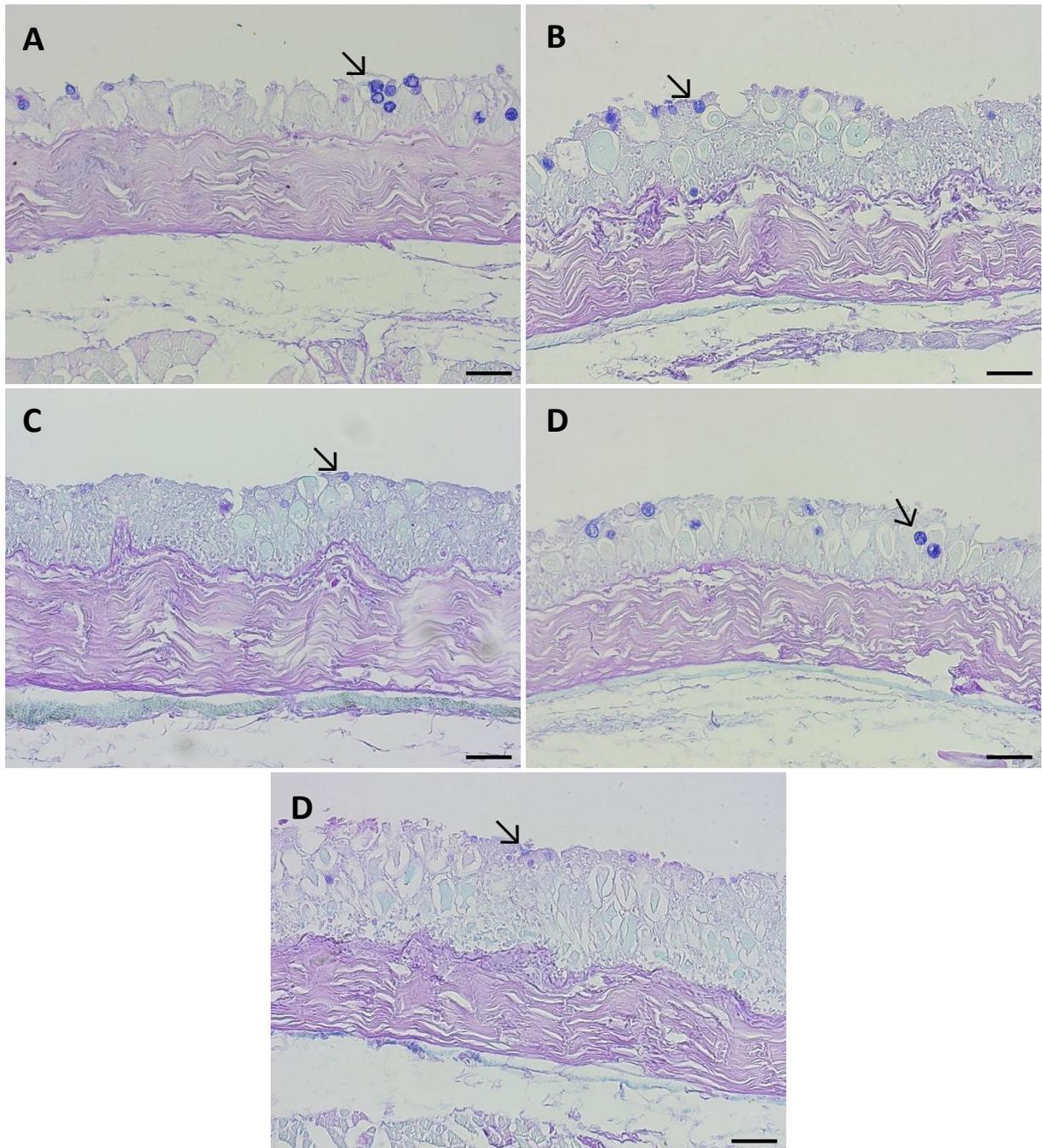


Figura 4: Fotomicrografia de pele de jundiá (*Rhamdia quelen*) infectados naturalmente por *A. hydrophila* alimentados com dietas contendo diferentes doses da nanoemulsão de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OECF). Peixes alimentados com a dieta controle (Cntrl: dieta sem OECF) não infectados (A); Peixes naturalmente infectados, alimentados com as dietas experimentais (0,25, 0,5, 1,0, 2,0 mL OECF/kg de dieta) (B, C, D e E, respectivamente). Setas: células mucosas. Coloração PAS e Alcian Blue. Barra de escala = 50 μ m. Aumento 20x.

Marcadores de status oxidativo

Peixes alimentados com 0,5 mL/kg de nanoemulsão de OECF apresentaram redução nos níveis de TBARS ($p < 0,05$) quando comparados com os peixes não infectados e alimentados com a dieta controle (Fig. 5A). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$), nos níveis de TBARS dos peixes alimentados com 0,25, 1,0 e 2,0 mL de nanoemulsão de OECF em relação aos animais não infectados e alimentados com a dieta controle (Fig. 5A). Peixes alimentados com 0,5 e 2,0 mL/kg nanoemulsão de OECF na dieta apresentaram níveis significativamente maiores de (TAC) ($p < 0,05$) que os peixes alimentados com os outros níveis de nanoemulsão de OECF na dieta. Os Valores de (TAC) não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre os peixes alimentados com grupo controle (0), 0,25 e 1,0 mL/kg nanoemulsão de OECF na dieta (Fig. 5B).

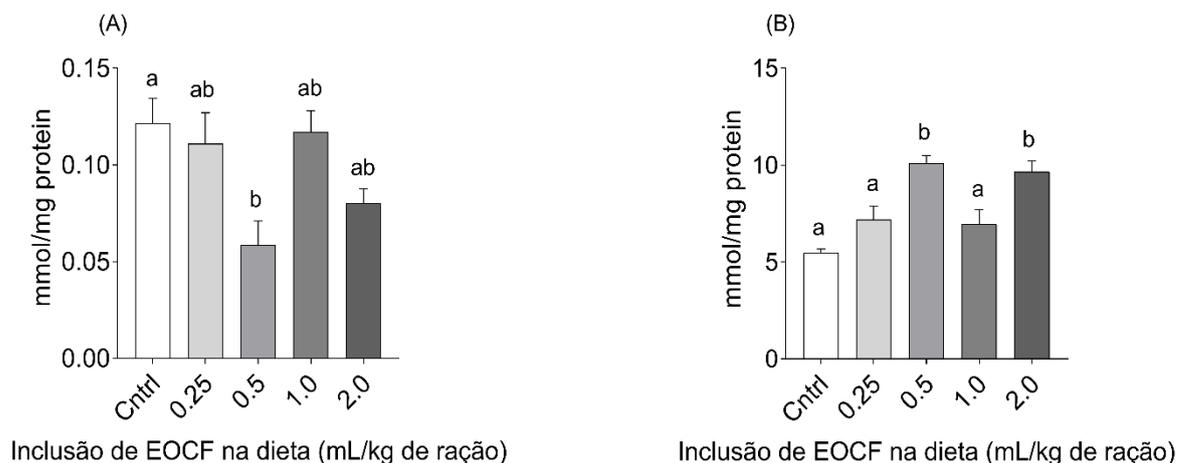


Figura 5: Substâncias reativas aos níveis de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (A), capacidade antioxidante total (TAC) (B), nas brânquias de juvenis de jundiá (*R. quelen*) suplementados com nanoemulsão de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OECF) em diferentes doses. Cntrl: controle (dieta sem OECF) não infectado. Os valores são expressos como a média \pm SEM ($n = 8$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos.

Histologia hepática

Os tecidos hepáticos dos peixes do grupo controle não infectados (Fig. 6A) apresentaram um parênquima hepático de aparência macroscópica normal, com hepatócitos normais, citoplasma bastante homogêneo e núcleo arredondado. Além disso, a veia centro lobular e capilares sinusóides apresentaram estrutura normal. Grupos de peixes alimentados

com os outros tratamentos dietéticos apresentaram fígado com uma estrutura semelhante ao do grupo controle, sem nenhuma lesão patológica observada (Fig. 6B-E).

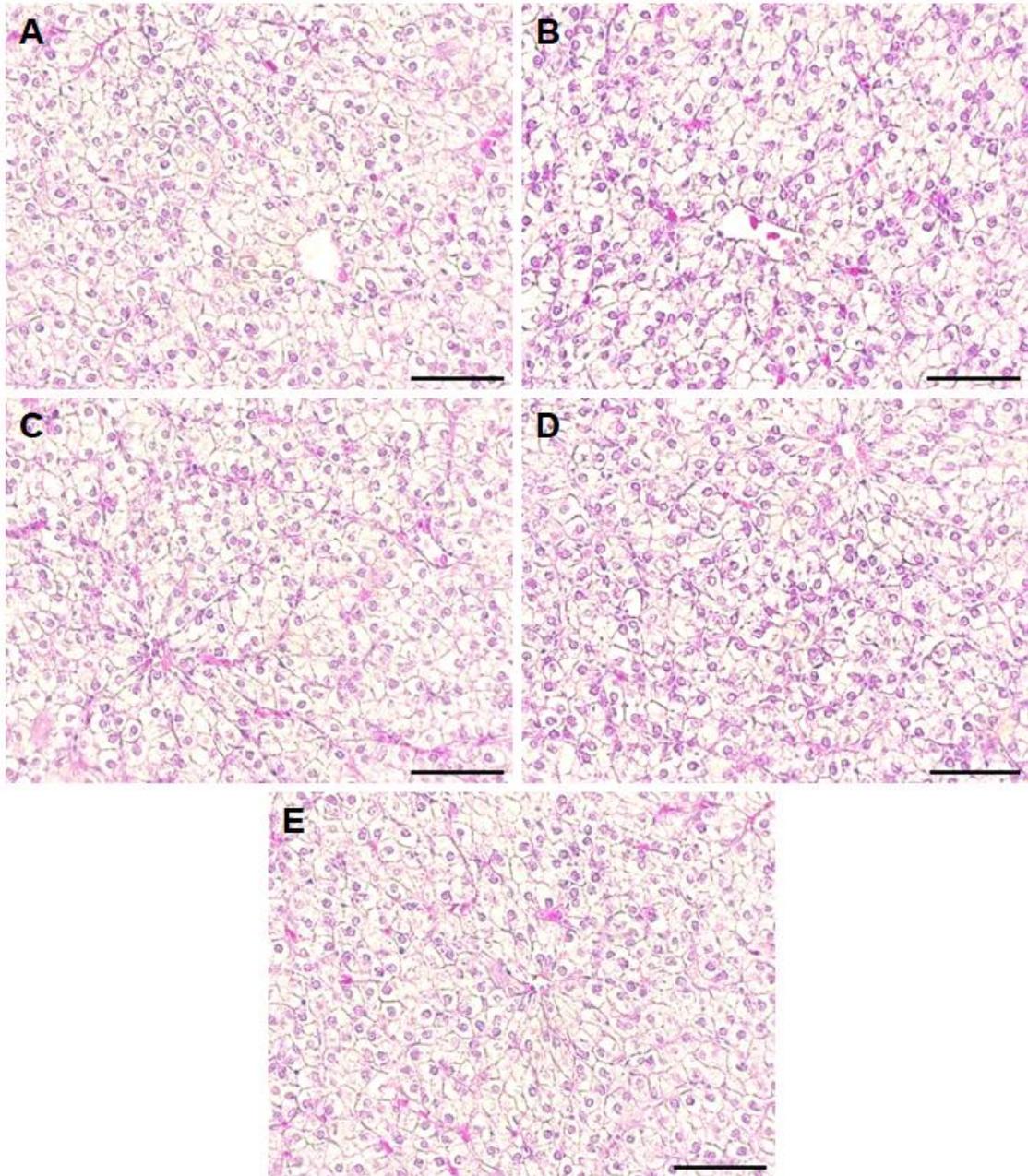


Figura 6: Fotomicrografias de fígado de jundiá (*Rhamdia. quelen*) infectados naturalmente por *A. hydrophila* alimentados com dietas contendo diferentes doses de nanoemulsão de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OECE). Peixes alimentados com a dieta controle (Cntrl: dieta sem OECE) não infectados (A); Peixes naturalmente infectados, alimentados com as dietas experimentais (0,25, 0,5, 1,0, 2,0 mL/kg de dieta) (B, C, D e E, respectivamente). Coloração de Hematoxilina & Eosina (H & E). Barra de escala = 50 μ m. Aumento 40x.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, jundiás naturalmente infectados por *A. hydrophila* alimentados com concentrações de 1,0 e 2,0 mL/kg de dieta da nanoemulsão do OECF apresentaram hiperplasia interlamelar. Modificações histopatológicas nas brânquias de peixes têm sido relacionadas a infecções por *A. hydrophila*, e hiperplasia interlamelar foi observada em tilápia azul (*Oreochromis aureus*) infectada experimentalmente (ALYAHYA *et al.*, 2018; MARINHO-NETO *et al.*, 2019). Mudanças histopatológicas também têm sido atribuídas a altas doses de alguns componentes de óleos essenciais que quando adicionados na dieta podem causar toxicidade e lesões nas brânquias de peixes (BRUM *et al.*, 2018). Assim, sugerimos que pesquisas possam ser realizadas para investigar a tolerância das brânquias de jundiá a diferentes concentrações da nanoemulsão do OECF, a fim de definir uma dosagem terapêutica.

As superfícies mucosas das brânquias e pele conferem proteção, sendo fundamentais para a saúde dos peixes (NIMALAN *et al.*, 2022). A melhora na estrutura da mucosa tem sido relacionada à presença de ingredientes imunoestimulantes na dieta. Por exemplo, em estudo avaliando a inclusão de 100 e 200 mg kg⁻¹ do extrato de semente de uva na dieta sobre os parâmetros imunológicos da mucosa de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), foi observado que os animais alimentados com os tratamentos dietéticos apresentaram aumento no tamanho e densidade de células mucosas nas brânquias e pele (MOUSAVI *et al.*, 2021). Esse resultado pode estar relacionado à presença de proantocianidinas no extrato de sementes de uva, as quais demonstraram efeito imunoestimulante da mucosa (NICHOLS; KATIYAR, 2010).

No presente estudo, jundiás infectados naturalmente por *A. hydrophila* e alimentados com 0,5 mL/kg de nanoemulsão de OECF apresentaram maior tamanho de células mucosas no epitélio branquial em relação ao grupo controle. Nossos resultados podem estar associados ao monoterpeno citral e seu isômero β geranial (α -citral), componentes majoritários do OECF utilizado neste estudo (GÜNDEL *et al.*, 2018), reconhecidos por suas propriedades imunomoduladoras (BACHIEGA; SFORCIN, 2011). Não foi observada diferença significativa na densidade celular entre peixes alimentados com as dietas experimentais e o grupo controle, contudo, uma redução na densidade de células mucosas foi verificada entre os animais alimentados com 0,25 mL/kg de nanoemulsão e os alimentados com 0,5 e 2,0 mL/kg de nanoemulsão de OECF. Esse resultado sugere que a dieta suplementada com 0,25 mL/kg de dieta da nanoemulsão do OECF não conseguiu estimular o aumento da densidade celular, entretanto, pode ter minimizado os efeitos de hiperplasia resultantes da infecção microbiana.

Essa mesma dose do OEFC não melhorou as respostas bioquímicas e fisiológicas de tilápias do Nilo desafiadas por *A. hydrophila* (SOUZA *et al.*, 2020).

A análise histológica do epitélio cutâneo indicou que o tamanho das células mucosas de jundiá foi significativamente menor nos grupos de peixes tratados com 0,5 e 2,0 mL/kg da nanoemulsão do OEFC em relação aos outros grupos. Uma razão que poderia explicar essa redução no tamanho das células mucosas na pele de jundiás pode ser o estado fisiológico das células mucosas dos animais desses grupos no momento da coleta das amostras. Sabe-se que as células mucosas reduzem de tamanho após a secreção do muco para a superfície do epitélio cutâneo. Assim, o menor tamanho de células observado neste estudo pode ser em consequência do aumento na secreção de muco, que pode ter causado uma redução do volume celular pela eliminação do muco no grupo de peixes alimentado com 0,5 e 2,0 mL/kg da nanoemulsão do OEFC nas dietas.

A densidade de células mucosas pode reduzir em função da infecção bacteriana (ALKAN; ÖĞÜZ, 2022). Foi relatado que se o desafio provocado pela carga bacteriana superar a capacidade da barreira mucosa de se defender, a densidade de células mucosas diminuiria, indicando um estado de esgotamento (LEDY; GIAMBÉRINI; PIHAN, 2003). No entanto, em nosso estudo a densidade de células mucosas do epitélio cutâneo não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, indicando que a densidade de células mucosas na pele de jundiá infectado naturalmente por *A. hydrophila* manteve-se estável, sugerindo um equilíbrio entre o desafio e resposta. Resultado semelhante ao nosso foi observado em trabalho que avaliou a densidades de células mucosas em *Myoxocephalus scorpius* parasitados naturalmente por digenéticos na pele (DANG *et al.*, 2019).

O status de barreira pode ser entendido como uma representação matemática da qualidade da barreira da superfície epitelial em função do tamanho da célula mucosa e da densidade volumétrica (LAZADO *et al.*, 2020). Em nossos resultados não foi observado diferença significativa no status de barreira do epitélio branquial e cutâneo de juvenis de jundiá naturalmente infectados por *A. hydrophila*. Esse resultado sugere que o estado de barreira não foi prejudicado pela infecção natural por *A. hydrophila*. Resultado similar foi observado em estudo que avaliou o estado da barreira em *M. scorpius* capturados em áreas com diferentes concentrações de chumbo (DANG *et al.*, 2019).

A peroxidação lipídica é um processo patológico provocado pela toxicidade do oxigênio (BANDEIRA JUNIOR *et al.*, 2021) que causa danos aos lipídios sensíveis à oxidação (YAN *et al.*, 2015). Esse processo pode ser monitorado pela reação do malonaldeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

(HU; ZHONG, 2010). Os níveis de TBARS são comumente utilizados como indicadores de danos causados por estresse oxidativo (DINARDO *et al.*, 2021).

Danos oxidativos relacionados ao aumento nos níveis de MDA em tecidos de peixes acometidos por aeromonose foram apontados na revisão de (BANDEIRA JUNIOR; BALDISSEROTTO, 2020). Em estudo avaliando o efeito antioxidante e a resistência do tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentado com dietas contendo OE de *Mentha piperita* frente à infecção por *A. hydrophila* foi observado o aumento dos níveis de TBARS hepático e renal no grupo infectado e tratado com as dietas experimentais quando comparado com o grupo controle não infectado (RIBEIRO *et al.*, 2018). Corroborando com esses resultados, o aumento nas concentrações de TBARS hepático e renal também foi observado em jundiás (*R. quelen*) infectados por *Aeromonas caviae* (BALDISSERA *et al.*, 2018).

No presente estudo, jundiás naturalmente infectados por *A. hydrophila* apresentaram níveis reduzidos de TBARS após serem alimentados por 21 dias com dietas contendo 0,5 mL/kg de nanoemulsão do OECF. Os terpenoides apresentam atividade antioxidante de quebra de cadeia, similar a dos fenóis (GONZALEZ-BURGOS; GOMEZ-SERRANILLOS, 2012; LING *et al.*, 2022). As propriedades antioxidantes do OECF têm sido fortemente associadas ao monoterpeno citral, que possui importante atividade antioxidante (LING *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2018a). No entanto, o citral em sua forma livre é hidrofóbico. Além disso, é instável, podendo sofrer degradação oxidativa se não for armazenado de forma correta, o que pode comprometer sua atividade antioxidante (LU *et al.*, 2018). Desta forma, faz-se necessária a utilização de tecnologias para protegê-lo contra oxidação.

A nanoemulsão é conhecida por proteger os fármacos contra mecanismos de degradação (DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2007) e demonstrou ser um excelente mecanismo de proteção para o citral (LU *et al.*, 2018). Deste modo, em nossos resultados, acreditamos que a nanoemulsão protegeu os compostos antioxidantes do OECF contra possíveis danos oxidativos, preservando suas características. Assim, atribuímos a redução dos níveis de TBARS observadas no presente estudo à presença do citral em conjunto com outros componentes antioxidantes do OECF, que inibiram a peroxidação, reduzindo os danos lipídicos causados pela infecção natural por *A. hydrophila*.

Em organismos aquáticos a análises das respostas antioxidantes têm sido realizadas em termos da capacidade antioxidante total (TAC) de um tecido (AMADO *et al.*, 2009). A TAC pode ser entendida como a capacidade protetora de um conjunto de antioxidantes presentes em um tecido em reduzir determinado tipo de EROs, possibilitando uma visão global do estado antioxidante deste tecido (PRIOR, 2015). Neste estudo, a nanoemulsão do OECF nas doses de

0,5 e 2,0 mL/kg de dieta aumentou a TAC nas brânquias de jundiás infectados naturalmente por *A. hydrophila*. Esse resultado pode ser atribuído à ação antioxidante dos componentes presentes no OEFC no tecido branquial. Além disso, a nanoemulsão aumenta a biodisponibilidade OEs no organismo dos peixes (AYDIN; BARBAS, 2020), o que pode ter potencializado a atividade antioxidante do OEFC, resultando na melhora da atividade do sistema antioxidante enzimático e não enzimático dos animais.

A análise histológica do tecido hepático pode ser uma importante ferramenta para auxiliar na identificação de alterações patológicas provocadas por agentes químicos ou infecciosos (VAN DYK; COCHRANE; WAGENAAR, 2012; WANG *et al.*, 2017). Isso porque o fígado é um órgão-alvo, frequentemente acometido por infecção bacteriana (CHEN *et al.*, 2018). Por esse motivo é considerado um ótimo indicador do estado fisiológico e da saúde dos animais (WANG *et al.*, 2014).

Em peixes as alterações hepáticas têm sido frequentemente observadas e associadas à contaminação por *A. hydrophila* (DONG *et al.*, 2017). Foi relatado que em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a infecção natural ou experimental por *A. hydrophila* causou dilatação e congestão dos capilares sinusoides e necrose hepática grave (ABDEL-LATIF; KHAFAGA, 2020; ALYAHYA *et al.*, 2018), provocada principalmente por toxinas e produtos extracelulares gerados pela bactéria (ALLAN; STEVENSON, 1981). Resultado similar foi descrito no fígado de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não tratados submetidos à infecção experimental por *A. hydrophila* (MARINHO-NETO *et al.*, 2019).

Nossas observações não mostraram alterações na histologia hepática de grupos de juvenis de *R. quelen* naturalmente infectados por *A. hydrophila* alimentados com nanoemulsão do OEFC na dieta quando comparados com o grupo de peixes alimentados com a dieta controle e não infectados. Esses resultados podem estar relacionados ao potencial efeito antibacteriano do OEFC em inibir *in vitro* e *in vivo* infecção por *A. hydrophila* (SOUZA *et al.*, 2018b, 2020). A atividade antibacteriana do OEFC tem sido associada à presença de monoterpenos como o citral presente no OE. De forma simplificada foi demonstrado que o citral possui a capacidade de romper a estrutura lipídica e penetrar a parede celular bacteriana, resultando em lise celular e morte (SADDIQ; KHAYYAT, 2010).

A nanoemulsão do citral apresentou atividade antibacteriana contra diferentes tipos de bactérias tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella typhimurium* (LU *et al.*, 2018). Segundo os mesmos autores, esses resultados demonstram que a nanoemulsão pode ser um excelente mecanismo para proteção deste composto. Deste modo, em nossos resultados, acreditamos que a nanoemulsão protegeu os

compostos antibacterianos do OECF contra possíveis danos oxidativos, preservando suas características. A suplementação dietética da nanoemulsão do OECF para juvenis de *R. quelen*, neste estudo, foi benéfica, com potencial efeito hepatoprotetor dos peixes naturalmente infectados por *A. hydrophila*. Em recente pesquisa, foi verificado que a nanoemulsão potencializou a atividade antibacteriana do OE de canela (*Cinnamomum cassia*) em comparação com o óleo em seu estado livre em teste *in vitro* contra *A. hydrophila* (BANDEIRA-JUNIOR *et al.*, 2022).

CONCLUSÃO

Em conclusão, as maiores doses da nanoemulsão de OECF na suplementação dietética (1,0 e 2,0 mL/kg) não exercem efeito de preservação estrutural na morfometria branquial e cutânea dos jundiás infectados naturalmente pela *A. hydrophila*. Entretanto, a suplementação dietética de 0,5 mL/kg de dieta da nanoemulsão do OECF demonstrou efeito antioxidante, pois diminuiu os níveis de TBARS e aumentou a capacidade antioxidante total (TAC) nas brânquias de jundiás naturalmente infectados por *A. hydrophila*. A suplementação da nanoemulsão do OECF na dieta mostrou efeito hepatoprotetor em juvenis de jundiá.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATIF, H. M. R.; KHAFAGA, A. F. Natural co-infection of cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* with *Aeromonas hydrophila* and *Gyrodactylus cichlidarum* experiencing high mortality during summer. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 5, p. 1880–1892, 2020.
- ALKAN, Z.; OĞUZ, A. R. Investigation of some hormones affecting osmoregulation of Lake Van fish (*Alburnus tarichi*) during reproductive migration. **Aquaculture Research**, v. 53, n. 3, p. 1011–1018, 2022.
- ALLAN, B. J.; STEVENSON, R. M. W. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 27, n. 10, p. 1114–1122, 1981.
- ALYAHYA, S. A. *et al.* Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 182–185, 2018.
- AMADO, L. L. *et al.* A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 2115–2123, 2009.
- AYDIN, B.; BARBAS, L. A. L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. **Aquaculture**, v. 520, n. October, p. 734999, 2020.
- BACCEGA, B. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activity of the essential oil and nanoemulsion of *Cymbopogon flexuosus* against *Trichomonas gallinae*. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 11, n. 1, p. 32–43, 2021.

- BACHIEGA, T. F.; SFORCIN, J. M. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 909–913, 2011.
- BALDISSERA, M. D. *et al.* *Melaleuca alternifolia* essential oil enhances the non-specific immune system and prevents oxidative damage in *Rhamdia quelen* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*: Effects on cholinergic and purinergic systems in liver tissue. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 61, n. 2, p. 1–8, 2017.
- BALDISSERA, M. D. *et al.* The disturbance of antioxidant/oxidant balance in fish experimentally infected by *Aeromonas caviae*: Relationship with disease pathophysiology. **Microbial Pathogenesis**, v. 122, n. June, p. 53–57, 2018.
- BANDEIRA-JUNIOR, G. *et al.* The Use of Cinnamon Essential Oils in Aquaculture: Antibacterial, Anesthetic, Growth-Promoting, and Antioxidant Effects. **Fishes**, v. 7, n. 3, p. 1–15, 2022.
- BANDEIRA JUNIOR, G. *et al.* Combined effect of florfenicol with linalool via bath in combating *Aeromonas hydrophila* infection in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture**, v. 545, n. July, p. 1–12, 2021.
- BANDEIRA JUNIOR, G.; BALDISSEROTTO, B. Fish infections associated with the genus *Aeromonas*: a review of the effects on oxidative status. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 3, p. 1083–1101, 2020.
- BRUM, A. *et al.* Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 490, n. February, p. 98–107, 2018.
- CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 29, n. 3, p. 219–224, 1997.
- CHEN, N. *et al.* Histopathological analysis and the immune related gene expression profiles of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 83, n. June, p. 410–415, 2018.
- CUNHA, M. A. DA *et al.* Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet.pdf. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2107–2114, 2010.
- DANG, M. *et al.* Mucous cell responses to contaminants and parasites in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*) from a former lead-zinc mine in West Greenland. **Science of the Total Environment**, v. 678, n. April, p. 207–216, 2019.
- DANG, M. *et al.* Histological mucous cell quantification and mucosal mapping reveal different aspects of mucous cell responses in gills and skin of shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 100, n. January, p. 334–344, 2020.
- DAWOOD, M. A. O. *et al.* Antiparasitic and antibacterial functionality of essential oils: An alternative approach for sustainable aquaculture. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1–38, 2021.
- DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2547–2565, 2007.
- DEVI, M. A. *et al.* Antifungal activity and volatile organic compounds analysis of essential oils from *Cymbopogon species* using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass

- spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 3, n. March 2021, p. 1–6, 2021.
- DINARDO, F. R. *et al.* A multi-biomarker approach in european sea bass exposed to dynamic temperature changes under dietary supplementation with *Origanum vulgare* essential oil. **Animals**, v. 11, n. 4, p. 1–18, 2021.
- DONG, H. T. *et al.* *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 10, p. 1395–1403, 2017.
- DOYLE, D. *et al.* Transport and Barrier Functions in Rainbow Trout Trunk Skin Are Regulated by Environmental Salinity. **Frontiers in Physiology**, v. 13, n. May, p. 1–14, 2022.
- ESTEBAN, M. Á. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. **ISRN Immunology**, v. 2012, n. 2, p. 1–29, 2012.
- FLORES, F. C. *et al.* Nanostructured systems containing an essential oil: Protection against volatilization. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 968–972, 2011.
- GAO, S. *et al.* Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (*Cymbopogon flexuosus*) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* Species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–14, 2020.
- GOMES, L. DE C. *et al.* Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000.
- GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5319–5341, 2012.
- GÜNDEL, S. DA S. *et al.* Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, n. 4, p. 268–276, 2018.
- GÜNDEL, S. DA S. *et al.* *In vivo* antifungal activity of nanoemulsions containing eucalyptus or lemongrass essential oils in murine model of vulvovaginal candidiasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 1–5, 2020.
- HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271–280, 1995.
- HU, Z.; ZHONG, Q. Determination of thiobarbituric acid reactive substances in microencapsulated products. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 794–799, 2010.
- KUMAR, S. *et al.* Organic source on productivity of pomegranate–lemongrass-based agroforestry system in central India. **Agroforestry Systems**, v. 95, n. 4, p. 615–624, 2021.
- LAZADO, C. C. *et al.* Morphomolecular alterations in the skin mucosa of Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to peracetic acid-based disinfectant. **Aquaculture Reports**, v. 17, n. February, p. 100368, 2020.
- LEDY, K.; GIAMBÉRINI, L.; PIHAN, J. C. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta* fario in acidic, aluminium-containing stream water. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 56, n. 3, p. 235–240, 2003.

- LING, Q. *et al.* Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of Citral-Rich Chemotype *Cinnamomum camphora* and *Cinnamomum bodinieri*. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7356, 2022.
- LU, W. C. *et al.* Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 82–89, 2018.
- LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 711–747, 2016.
- MARINHO-NETO, F. A. *et al.* Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–20, 2019.
- MOUSAVI, S. *et al.* Changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth and mucosal immune parameters after dietary administration of grape (*Vitis vinifera*) seed extract. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 547–563, 2021.
- NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, v. 302, n. 2, p. 71–83, 2010.
- NIMALAN, N. *et al.* Mucosal barrier status in Atlantic salmon fed marine or plant-based diets supplemented with probiotics. **Aquaculture**, v. 547, n. June, p. 1–19, 2022.
- ÖZIL, Ö.; DILER, Ö.; NAZIROĞLU, M. Antifungal activity of some essential oil nanoemulsions against Saprolegniasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs: Antifungal activity of essential oil nanoemulsions. **Aquaculture International**, v. 30, n. 5, p. 2201–2212, 2022.
- PATHIRANA, H. N. K. S. *et al.* Determination of the in vitro effect of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) oil against fish pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Slovenian Veterinary Research**, v. 56, n. 3, p. 125–131, 2019.
- PITTMAN, K. *et al.* Novel method for quantifying salmonid mucous cells. **Journal of Fish Diseases**, v. 34, n. 12, p. 931–936, 2011.
- PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 18, n. 4, p. 797–810, 2015.
- RIBEIRO, S. C. *et al.* Antioxidants effects and resistance against pathogens of *Colossoma macropomum* (Serassalmidae) fed *Mentha piperita* essential oil. **Aquaculture**, v. 490, n. October 2017, p. 29–34, 2018.
- SADDIQ, A. A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, n. 1, p. 89–93, 2010.
- SANTOS, A. C. DOS *et al.* Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 44, n. 1, p. 106–113, 2017.
- SOUZA, C. D. F. *et al.* Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish : a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver

- catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiol Biochem**, v. 44, n. 2, p. 21–34, 2018a.
- SOUZA, E. M. DE *et al.* Chemical composition and evaluation of the antimicrobial activity of two essential oils. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 2, p. 44–47, 2018b.
- SOUZA, E. M. DE *et al.* *Cymbopogon flexuosus* essential oil as an additive improves growth, biochemical and physiological responses and survival against *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 1, p. 1–12, 2020.
- SUN, B. Y. *et al.* Increased susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in grass carp with antibiotic-induced intestinal dysbiosis. **Aquaculture**, v. 552, n. 1, p. 737969, 2022.
- VALENTI, W. C. *et al.* Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 1–18, 2021.
- VAN DYK, J. C.; COCHRANE, M. J.; WAGENAAR, G. M. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. **Chemosphere**, v. 87, n. 4, p. 301–311, 2012.
- WANG, L. N. *et al.* Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on non-specific immune responses, oxidative status and liver histology of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture**, v. 426–427, p. 41–48, 2014.
- WANG, S. T. *et al.* Biological parameters, immune enzymes, and histological alterations in the livers of grass carp infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 70, n. August, p. 121–128, 2017.
- YAN, S. *et al.* Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 54–60, 2015.
- YOUNIS, N. A. *et al.* *Cyathocotylidae* spp and motile aeromonads co-infections in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) causing mass mortality. **Microbial Pathogenesis**, v. 174, n. November 2022, p. 105897, 2023.
- ZEPPENFELD, C. C. *et al.* Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*).pdf. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 933–940, 2016.
- ZHENG, T. *et al.* Transport Stress Induces Skin Innate Immunity Response in Hybrid Yellow Catfish (*Tachysurus fulvidraco*♀ × *P. vachellii*♂) Through TLR/NLR Signaling Pathways and Regulation of Mucus Secretion. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1–14, 2021.