**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**
**JESSICA DA SILVA OLIVEIRA**

# Efeito do Carvacrol, Timol e Ácido Cinamaldeído no microbioma intestinal durante a larvicultura da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

**MOGI DAS CRUZES/SP**
**2025**

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

**JESSICA DA SILVA OLIVEIRA**

# Efeito do Carvacrol, Timol e Ácido Cinamaldeído no microbioma intestinal durante a larvicultura da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestra em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios.

Orientadora: Dra. Micheli Zaminhan Hassemer

**MOGI DAS CRUZES/SP**

**2025**

FINANCIAMENTO





**Ficha catalográfica**
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

O48e

Oliveira, Jessica da Silva
Efeito do Carvacrol, Timol e Ácido Cinamaldeído no microbioma intestinal durante a larvicultura da Tilápia-do-Nilo (Oreochromis niloticus) / Jessica da Silva Oliveira. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
87 f.: il.
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
Orientação: Profa. Dra. Micheli Zaminhan Hassemer.
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf.

1. Tilápia 2. Ciclídeos 3. Microbioma gastrointestinal 4. Compostos fitoquímicos 5. Óleos Voláteis I. Hassemer, Micheli Zaminhan II. Universidade e Mogi das Cruzes III. Título

CDD 597

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

# ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às nove horas do dia dez de fevereiro de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada: "ÓLEOS ESSENCIAIS NA FASE LARVICULTURA DA TILÁPIA DO NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS)", para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Jéssica da Silva Oliveira**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Micheli Zaminhan Hassemer, e Sylvia Sanae Takishita, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Elenice Souza dos Reis Goes, da Universidade Federal da Grande Dourados. Sob a presidência da primeira, como orientadora da dissertação. A sessão pública da defesa da dissertação foi aberta pela senhora presidenta da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovada (aprovado(a) /reprovado(a)) por Unanimidade (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 10 de fevereiro de 2025.

| Comissão Examinadora | Julgamento |
|---|---|
| Documento assinado digitalmente gov.br ELENICE SOUZA DOS REIS GOES Data: 10/02/2025 14:18:28-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br | |
| Profª Drª Elenice Souza dos Reis Goes | Aprovada (aprovado(a) / reprovado(a)) |
| Documento assinado digitalmente gov.br SYLVIA SANAE TAKISHITA Data: 10/02/2025 15:59:53-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br | |
| Profª Drª Sylvia Sanae Takishita | Aprovada (aprovado(a) / reprovado(a)) |
| Documento assinado digitalmente gov.br MICHELI ZAMINHAN HASSEMER Data: 10/02/2025 16:28:22-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br | |
| Drª Micheli Zaminhan Hassemer | Aprovada (aprovado(a) / reprovado(a)) |

UMC
UNIVERSIDADE

Tel.: (11) 4798-7000
0800 19 2001
www.umc.br



# ADENDO

ADENDO À ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às nove horas do dia dez de fevereiro de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada: "ÓLEOS ESSENCIAIS NA FASE LARVICULTURA DA TILÁPIA DO NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS)" pelo(a) candidato(a) **Jessica da Silva Oliveira**, para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Em adendo, informo que a banca sugeriu alteração no título da dissertação, que foi acatada pelo(a) candidato(a). Portanto o título correto é: "EFEITO DO CARVACROL, TIMOL E ÁCIDO CINAMALDEÍDO NO MICROBIOMA INTESTINAL DURANTE A LARVICULTURA DA TILÁPIA-DO-NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS)".

Mogi das Cruzes, 07 de abril de 2025.

Profª Drª Tatiane Faustino de Moraes
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia

*Dedico este trabalho ao meu filho Gustavo, que sempre despertou o melhor de mim e desde cedo compreendeu a minha dedicação à pesquisa, mesmo quando isso significava menos tempo para brincadeiras. Ao meu esposo Wesley, por todo companheirismo em minhas jornadas, seu apoio e fé em mim foram meu alicerce e um consolo nos momentos mais difíceis. Aos meus pais Lúcia e Almir, por me proporcionarem uma educação valiosa, seus sacrifícios e apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho. Ao meu irmão Graciano, por me apresentar o poder da educação e contribuir na formação da mulher que sou.*

*Nada seria possível sem o apoio e amor de todos vocês.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida, pela saúde e por permitir que eu chegasse até aqui.

A Universidade de Mogi das Cruzes - UMC e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de cursar o mestrado e por toda infraestrutura fornecida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2019/00795-0.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP) pela concessão da bolsa durante a realização da pesquisa.

A minha orientadora Dra. Micheli Zaminhan Hassemer pelos ensinamentos e orientação.

Ao meu coorientador, Prof.º Drº Alexandre Wagner Hilsdorf por abrir as portas do LAGOAA para mim e por todos os ensinamentos, sendo sempre um exemplo de pesquisador, ético, apaixonado pela profissão que escolheu.

A toda equipe do laboratório LAGOAA por todo conhecimento compartilhado, especialmente a Nane, a Sabrina e a Gabriela, por todos os momentos de companheirismo, pelos trabalhos compartilhados e por momentos de descontração.

Aos integrantes do LAFINUTRI por toda estrutura para condução dos experimentos, ao Bruno por todos os ensinamentos e parceria, a Júlia, a Sabrina e a Mariana por toda ajuda, por nossas conversas e risadas e também por toda parceria sempre.

A técnica Ethiene do LAMEROA por todos os ensinamentos, pelos almoços ao ar livre e por nossas conversas.

Aos professores do programa por todo conhecimento compartilhado.

A minha família, meu filho Gustavo, meu esposo Wesley, meus pais Lúcia e Almir, meus irmãos Graciano e Danielle por sempre acreditarem e por apoiarem meus sonhos sempre.

Aos meus amigos da ictiologia, Daiane e Lúcio, responsáveis pela minha paixão por peixes dulcícolas, meus amigos de infância Adrielle, Gabriella e Thiago por sempre serem meu colo e minha fortaleza e aos amigos que a biologia me presenteou Jonathas e Isabela por toda força e por nunca deixar de acreditar em mim.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui, obrigada!

**“***Aqueles que contemplam a beleza da terra, encontram reservas de força que irão perdurar enquanto a vida durar. Há algo infinitamente curativo nos refrões repetidos da natureza: a garantia de que o amanhecer vem depois da noite e a primavera depois do inverno.”*

*(Rachel Carson)*

## RESUMO

A tilapicultura se encontra em crescente expansão no Brasil, com isso, a produção de organismos mais resistentes em cada fase de desenvolvimento é um desafio. O uso de aditivos naturais pode ser uma alternativa promissora e sustentável na cadeia produtiva. Nesse sentido, objetivou-se testar a inclusão dos óleos essenciais de carvacrol, timol e ácido cinamaldeído de forma isolada e um composto (*blend*) contendo esses três componentes, como suplemento na ração na fase larval durante a reversão sexual das tilápias, sobre parâmetros de desempenho produtivo e microbioma intestinal. O estudo experime ntal empregou um delineamento em blocos com variações ao acaso, composto por cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos compreenderam uma dieta controle e quatro dietas experimentais suplementadas com 0,25% de compostos bioativos liofilizados e microencapsulados (carvacrol, cinamaldeído, timol e um blend dos três). O experimento foi conduzido em 20 unidades experimentais (tanques-hapas de 1 m³), cada uma contendo 120 larvas de peixes com peso inicial médio de 0,02 g. A alimentação foi administrada seis vezes ao dia durante 35 dias. Ao final do experimento, todos os animais foram pesados e medidos para posterior cálculo do desempenho produtivo. Para análise de microbioma, foi realizada a coleta do intestino. Os alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com as dietas contendo óleos essenciais não apresentaram diferenças significativas ($P<0,05$) nos parâmetros de desempenho produtivo e na modulação da microbiota intestinal. No entanto, as análises indicaram um equilíbrio na composição da microbiota, sugerindo a manutenção da homeostase intestinal. Além disso, a ausência de desafios fisiológicos ou ambientais aos peixes, devido às condições favoráveis do experimento, pode ter limitado a avaliação do potencial modulador dos óleos essenciais, uma vez que seus efeitos são mais evidentes em situações de estresse ou desequilíbrio no organismo hospedeiro.



**Palavras-chave:** antimicrobiano; microbioma; saúde intestinal; compostos bioativos.

## ABSTRACT

Tilapia farming is undergoing rapid expansion in Brazil. As a result, producing more resilie nt organisms at each developmental stage remains a challenge. The use of natural additives may be a promising and sustainable alternative in the production chain. In this context, this study aimed to evaluate the inclusion of essential oils from carvacrol, thymol, and cinnamalde hyde individually, as well as a blend containing these three components, as dietary supplements during the larval stage of the Nile tilapia, specifically during sex reversal, assessing their effects on growth performance parameters and intestinal microbiota. The experimental study followed a randomized block design with five treatments and four replicates. The treatments included a control diet and four experime ntal diets supplemented with 0.25% of freeze-dried and microencapsulated bioactive compounds (carvacrol, cinnamaldehyde, thymol, and a blend of all three). The experiment was conducted in 20 experimental units (1 $m^3$ hapa tanks), each containing 120 fish larvae with an initial average weight of 0.02 g. Feeding was administered six times daily for 35 days. At the end of the experiment, all fish were weighed and measured for subsequent performance evaluation, and intestinal samples were collected for microbiota analysis. Nile tilapia larvae fed diets containing essential oils showed no significa nt differences ($P<0.05$) in growth performance parameters or intestinal microbiota modulat io n. However, analyses indicated a balanced microbiota composition, suggesting the maintena nce of intestinal homeostasis. Furthermore, the absence of physiological or environme ntal challenges for the fish, due to the favorable experimental conditions, may have limited the assessment of the modulator potential of essential oils, as their effects are more pronounced under stress or imbalance in the host organism.



**Key - Words:** antimicrobial; microbiome; gut health; bioactive compounds.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**FIGURA 1 -** TILÁPIA DO NILO *(OREOCHROMIS NILOTICUS)* ..... 20
**FIGURA 2** – ESTRUTURA DAS PAREDES BACTERIANAS DE GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS ..... 26
**FIGURA 3** – ESTRUTURA MOLECULAR DO CARVACROL ..... 28
**FIGURA 4 –** ESTRUTURA MOLECULAR DO TIMOL ..... 29
**FIGURA 5** – ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO CINAMALDEÍDO ..... 31
**FIGURA 6** – MICROBIOMA IDENTIFICADO POR HUAIQUIPÁN *ET AL*. (2023) NO TRATO GASTROINTESTINAL DA TILÁPIA-DO-NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS). ..... 37
**FIGURA 7** – PISCICULTURA DA BARRAGEM PONTE NOVA, SALESÓPOLIS-SP. ... 39
**FIGURA 8 -** DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ..... 41
**FIGURA 9** – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA DISPOSIÇÃO DOS TRATAMENTOS NOS TANQUES HAPAS ..... 41
**FIGURA 10 -** INCORPORAÇÃO DE OXIGÊNIO NA ÁGUA POR MEIO DE AERADOR CHAFARIZ ..... 42
**FIGURA 11 -** ENCERRAMENTO DO EXPERIMENTO A CAMPO ..... 43
**FIGURA 12** - COLETA DE INTESTINO PARA ANÁLISE DO MICROBIOMA ..... 44
**FIGURA 13 –** SEQUENCIAMENTO NO ILLUMINA MISEQ ..... 45
**FIGURA 14** - DIVERSIDADE BETA DO MICROBIOMA DE ALEVINOS DE TILÁPIAS (O. NILOTICUS) ..... 50
**FIGURA 15** - ALFA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE ALEVINOS DE TILÁPIAS ..... 51
**FIGURA 16** - DIVERSIDADE ALFA, REPRESENTADO PELO ÍNDICE DE RIQUEZA CHAO DA MICROBIOTA DE ALEVINOS DE TILÁPIA (O. NILOTICUS) ..... 51
**FIGURA 17** – DIVERSIDADE ALFA, REPRESENTADO PELO ÍNDICE DE EQUITABILIDADE DE PIELOU DA MICROBIOTA DE ALEVINOS DE TILÁPIA (O. NILOTICUS) ..... 52
**FIGURA 18** – ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS DISTINTAS OTUS DA MICROBIOTA INTESTINAL DE ALEVINOS DE TILÁPIA A NÍVEL DE FILO ..... 53
**FIGURA 19** - ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS DISTINTAS OTUS DA MICROBIOTA INTESTINAL DE ALEVINOS DE TILÁPIA A NÍVEL DE CLASSE ..... 54

**FIGURA 20** - ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS DISTINTAS OTUS DA MICROBIOTA INTESTINAL DE ALEVINOS DE TILÁPIA A NÍVEL DE ORDEM..... 55
**FIGURA 21** – ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS DISTINTAS OTUS DA MICROBIOTA INTESTINAL DE ALEVINOS DE TILÁPIA A NÍVEL DE FAMÍLIA..... 56
**FIGURA 22** – ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS DISTINTAS OTUS DA MICROBIOTA INTESTINAL DE ALEVINOS DE TILÁPIA A NÍVEL DE GÊNERO..... 57
**FIGURA 23 -** MOLÉCULAS E METABÓLITOS PRODUZIDOS PELA MICROBIOTA INTESTINAL ..... 61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| ERO | Espécies Reativas de Oxigênio |
| LPS | Lipopolissacarídeos |
| OE | Óleo Essencial |
| OEs | Óleos essenciais |
| OTU | Unidade Taxonômica Operacional |
| PAMPs | Padrões Moleculares de Micróbios |
| RRPs | Receptores de Reconhecimento de Padrões |
| TGI | Trato Gastrointestinal |
| MDA | Malondialdeído |
| CCT | Coeficiente de Crescimento Térmico |
| MHC | Moléculas Clássicas de Histocompatibilidade |
| SCFA | Ácidos Graxos de Cadeia Curta |

**SUMÁRIO**

**1. INTRODUÇÃO ..... 15**

1.1. DESAFIOS DA PISCICULTURA NO BRASIL ..... 17

1.2 TILÁPIA DO NILO - *OREOCHROMIS NILOTICUS* ..... 19

**2. ÓLEOS ESSENCIAIS COM COMPOSTOS BIOATIVOS ..... 22**

2.1. CARVACROL ..... 27

2.2. TIMOL ..... 29

2.3. ÁCIDO CINAMALDEÍDO ..... 30

2.4. LIOFILIZAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO DOS COMPOSTOS DE OEs ..... 32

**3. METAGENÔMICA ..... 33**

3.1. MICROBIOTA INTESTINAL DOS PEIXES ..... 34

**4. MATERIAL E MÉTODOS ..... 39**

4.1. PEIXES E MANEJO ..... 39

*4.1.1. Dietas experimentais e manejo alimentar ..... 39*

*4.1.2. Peixes e condições experimentais ..... 40*

*4.1.3. Coleta de dados ..... 42*

4.2. MICROBIOMA INTESTINAL ..... 43

4.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS ..... 45

*4.3.1. Desempenho produtivo ..... 45*

*4.3.2. Microbioma intestinal ..... 46*

**5. RESULTADOS ..... 49**

5.1. DESEMPENHO PRODUTIVO ..... 49

5.2. MICROBIOMA INTESTINAL ..... 50

**6. DISCUSSÃO ..... 58**

6.1. DESEMPENHO PRODUTIVO ..... 58

6.2. MICROBIOMA INTESTINAL ..... 61

**7. CONCLUSÃO ..... 69**

**REFERÊNCIAS ..... 70**

# 1. INTRODUÇÃO

A produção aquícola tem crescido significativame nte, impulsionada pela busca por hábitos alimentares mais saudáveis. A tilápia (*Oreochromis sp*.) destaca-se como uma das espécies mais cultivadas globalmente e no Brasil (FAO, 2024). No entanto, a intensificação da produção resulta em maiores níveis de estresse para os peixes, devido às elevadas densidades de estocagem e à deterioração da qualidade da água (Sánchez-Muros *et al.*, 2016).

O controle de doenças na piscicultura é realizado com antibióticos, gerando preocupações ambientais, uma vez que resíduos dos antibióticos podem ficar acumulados na água circundante e no solo, podendo contribuir para o desenvolvimento de resistênc ia bacteriana, sendo uma ameaça crítica para a saúde pública (Lulijwa; Rupia; Alfaro, 2019).

Óleos essenciais (OEs) contendo compostos bioativos, como carvacrol, timol e ácido cinamaldeído, têm demonstrado potencial ao melhorar o desempenho produtivo, aumentar a atividade antioxidante e fortalecer a resposta imunológica dos peixes (Sousa et al., 2020; Chong *et al*., 2021; Acar *et al*., 2021; Kesbiç *et al*., 2024; Zeppenfeld *et al*., 2017; Al-Sagheer *et al.*, 2017; He *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020; Luz *et al.*, 2021). Esses compostos promovem a absorção de antioxidantes e modulam o equilíbrio redox e a resposta inflamatória, neutralizando as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que podem comprometer a integridade da barreira intestinal, especialmente sob estresse térmico (Celi & Gabai, 2015; Cottrell *et al*., 2015; Buntyn *et al.*, 2016; Liu *et al*., 2016). Além disso, os compostos dos OEs modulam a microbiota intestinal dos peixes, podendo resultar em uma maior diversidade microbiana, melhora na eficiência de absorção de nutrientes e na produção de metabólitos benéficos, como ácidos graxos de cadeia curta (Hoseinifar *et al*., 2018).

O equilíbrio do microbioma intestinal, promovido pelos probióticos, é fundamenta l para a homeostase e o desenvolvimento saudável dos peixes, influenciando seu crescimento, resistência a doenças e bem-estar geral (Ringø *et al*., 2016). Avanços em técnicas genômicas, como o sequenciamento de próxima geração (NGS), utilizam o gene 16S rRNA e ferramentas de bioinformática para identificar e descrever comunidades microbia nas,

aprimorando nossa compreensão de microbioma e seu impacto na saúde animal (Weinroth *et al*., 2022; Huaiquipán *et al*., 2023).

A dieta influencia a diversidade da microbiota intestinal promovendo o crescimento de bactérias benéficas que contribuem dificultando o crescimento e desenvolvimento de bactérias patogênicas na mucosa intestinal (Hoseinifar *et al*., 2024). Além disso, ela modula a função imunológica do TGI (trato gastrointestinal), afetando a produção de citocinas, a função da barreira intestinal e o metabolismo da microbiota, afetando a produção de peptídeos antimicrobianos que inibem o crescimento e a adesão de patógenos à mucosa intestinal (Yeoman *et al*., 2012; Yeoman; White, 2014).

A microbiota afeta a modulação intestinal através da maturação do tecido linfo id e associado ao intestino, via sinalização do gene MyD88 (Galindo-Villegas *et al*., 2012). Essa via inicia após a detecção de chaves moleculares essenciais denominadas como Padrões Moleculares Associados a Micróbios (PAMPs) como o ácido nucleico microbiano, β-glucano, peptideoglicano e lipopolissacarídeos (LPS) identificados por Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs) como os receptores *toll*-like (Ito 2014; Kelly & Salinas, 2017).

A produção piscícola depende de alevinos de qualidade, bem nutridos e criados em condições ambientais favoráveis, para garantir melhor desempenho produtivo nas etapas subsequentes (Höglund; Balm; Winberg, 2000; Almeida *et al*., 2009). Isso requer o uso de rações nutricionalmente adequadas e aditivos que promovam o crescimento e a saúde dos animais de forma sustentável (Giannenas *et al*., 2013; El-Hawarry; Mohamed; Safinaz, 2018). Os compostos bioativos dos OEs são aditivos promissores, pois fortalecem a imunidade, impulsionam o crescimento e modulam a microbiota intestinal dos peixes. (Aanyu; Betancor; Monroig, 2018; El-Harraway, 2018). Nesse estudo, investigou-se os efeitos isolados e em *blend* do carvacrol, timol e ácido cinamaldeído, utilizando a tecnologia de liofilização e microencapsulação para preservar as propriedades bioativas, avaliando seu impacto no desempenho produtivo e na composição do microbioma intestinal de alevinos de tilápia do Nilo.

## 1.1. DESAFIOS DA PISCICULTURA NO BRASIL

O aumento da produção de peixes em escala comercial no Brasil faz com que haja um novo ritmo de cultivo, aumentando a densidade de peixes nos viveiros. A alta densidade pode levar a uma série de efeitos adversos, incluindo a alteração do comportamento alimentar, a deterioração da qualidade da água e o aumento da suscetibilidade a estresses e patógenos oportunistas (Alexandre *et al*., 2010; Sánchez-Muros *et al*., 2016).

A densidade inadequada de estocagem pode prejudicar o crescimento e reduzir a competência imunológica, além de afetar a ingestão e a eficiência de conversão alimentar (Ellis *et al*., 2002). Além disso, pode prejudicar o crescimento, reduzir a competência imunológica e afetar a ingestão e a eficiência de conversão alimentar (Ellis *et al*., 2002).

Em sistemas de cultivo intensivo, a alta densidade pode agravar o estresse devido à deterioração da qualidade da água, superlotação ou interações sociais adversas, tais condições não apenas aumentam a susceptibilidade dos peixes a doenças, mas também podem promover comportamentos agressivos, aumentando o risco de danos físicos, como lesões nas nadadeiras (Damsgard *et al*., 1997; North *et al*., 2006).

O estresse associado à superlotação também tem um efeito direto sobre o metabolis mo, levando à ativação de vias catabólicas e ao aumento do estresse oxidativo, que pode causar danos significativos à saúde dos peixes (Vijayan *et al*., 1990; Pankhurst e van der Kraak, 1997). O estresse oxidativo, um processo sensível a várias condições ambientais, pode ser exacerbado por fatores como qualidade da água, salinidade, desafios nutricionais e exposição a xenobióticos (Sánchez-Muros *et al*., 2013; Sánchez-Muros *et al.*, 2016).

A alta densidade também pode influenciar o comportamento alimentar dos peixes. Sob condições estressantes, a alimentação pode ser impactada negativamente, como demonstrado em espécies como *Salmo salar* e *Sparus aurata* (Føre *et al*., 2016; Arechavala-Lopez *et al*., 2020). Estratégias de alimentação sob demanda têm sido exploradas para melhorar o crescimento e o bem-estar, mas o estresse pode afetar a capacidade cognitiva dos peixes, impactando seu aprendizado e memória em operar esses sistemas de alimentação (Folkedal *et al*., 2018).

Espécies como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus)* têm sido amplame nte cultivadas em diferentes sistemas com densidades variáveis. Contudo, é fundamental manter

a densidade populacional dentro de limites adequados para assegurar a saúde e o desempenho produtivo dos peixes. Em sistemas intensivos, densidades mais altas podem ser viáveis desde que sejam adotadas práticas de manejo adequados, como a manutenção da qualidade da água e a garantia de níveis adequados de oxigênio (Muir *et al*., 2000). No entanto, a definição de densidades ideais para diferentes espécies permanece um desafio, e a adaptação dos sistemas de manejo é necessária para mitigar os efeitos negativos da alta densidade nos viveiros.

Por este motivo, tem se buscado uma melhor eficiência alimentar e desenvolvime nto de rações que possam proporcionar uma maximização no desempenho zootécnico dos animais (Almeida *et al*., 2009). Contudo, o mercado de aditivos em rações para peixes ainda é insipiente. Visto que a alimentação é responsável pelos maiores custos de produção.

O desempenho produtivo dos peixes nas fases subsequentes do ciclo produtivo pode ser maximizado pela qualidade dos peixes nas fases iniciais de vida. A higidez de larvas e alevinos, crucial para o sucesso da produção, é diretamente influenciada pela adequação das necessidades nutricionais nas fases iniciais (Höglund; Balm; Winberg, 2000; Almeida *et al*., 2009). A produção de alevinos de alta qualidade é, portanto, um fator determinante para o sucesso na produção aquícola.

Durante a larvicultura e alevinagem, é essencial garantir que os animais recebam uma nutrição adequada para promover um desenvolvimento saudável e um desempenho produtivo ótimo nas fases subsequentes da produção. A utilização de rações formuladas especificamente para atender às necessidades nutricionais, juntamente com a aplicação de aditivos, pode contribuir significativamente para melhorar o estado de saúde dos animais e, consequentemente, maximizar seu desempenho produtivo (Almeida *et al*., 2009).

Alevinos de qualidade são essenciais para o sucesso da produção aquícola, essa qualidade, é determinada por diversos fatores, incluindo genética, nutrição, manejo e condições ambientais durante as fases iniciais de desenvolvimento (Fontes *et al*., 2019). A importância de utilizar alevinos de qualidade na produção está diretamente relacionada ao desempenho futuro dos peixes (Obirikorang *et al*., 2020). Alevinos saudáveis e bem desenvolvidos têm maior probabilidade de crescer de forma uniforme, apresentar melhor conversão alimentar e maior resistência a doenças, resultando em uma produção mais eficiente, com menor

mortalidade e melhor retorno econômico para o produtor (Fontes *et al*., 2019).

Na área da nutrição, observa-se uma crescente demanda por ingredientes e aditivos funcionais que visam melhorar o desempenho produtivo, a imunidade, a resistência e o bem-estar dos animais criados em cativeiro. A maior eficiência na utilização das rações resulta em um meio de produção mais sustentável e em animais mais resistentes. Por isso, pesquisadores buscam alternativas que possam promover esse cenário.

Nos últimos anos, tem sido estudada a utilização de ácidos orgânicos, enzimas, prebióticos, probióticos e aditivos naturais na produção animal (Giannenas *et al*., 2013; El-Hawarry; Mohamed; Safinaz, 2018). Os óleos essenciais têm se destacado na categoria de aditivos naturais, pois esses compostos possuem diversas características de interesse para a produção animal, tornando-se uma alternativa muito promissora na aquicultura (Aanyu; Betancor; Monroig, 2018; El-Hawarry; Mohamed; Safinaz, 2018).

Estudos para determinar a dosagem ideal desses aditivos e o desenvolvimento de produtos que possam ser inseridos no mercado são fundamentais para a elaboração de dietas de mínimo custo que permitam o máximo desempenho zootécnico e a saúde dos peixes (Ashley *et al*., 2017; Ramos *et al*., 2017).

## 1.2 TILÁPIA DO NILO - *Oreochromis niloticus*

A tilápia (*Oreochromis sp*) faz parte da família dos ciclídeos, caracterizados por peixes de águas continentais de regiões tropicais com o corpo coberto por escamas, alongado e comprimido lateralmente. São originárias de Israel, Jordânia indo até o continente africano, entretanto, foram difundidos em diversos países nos últimos 50 anos devido a sua facilidade de cultivo em diferentes climas e sistemas de produção (El-Sayed, 2019).

Ocorrem geralmente em lagos, rios e reservatórios e possuem hábitos preferencialmente diurnos. Possuem alimentação onívora se alimentando principalme nte de algas e fitoplâncton, atingem a maturidade sexual entre 3 e 6 meses de vida, com desovas ao longo de todo o ano em temperaturas acima de 20°C e alcançam sucesso reprodutivo uma vez que possuem cuidado parental, onde o macho constrói e protege o ninho, enquanto

a fêmea incuba os ovos na boca até as larvas terminarem de consumir todo saco vitelínico (Marceniuk; Hilsdorf, 2010, Abdel; Elhady; Shalaby, 2020).

No mundo, existem aproximadamente setenta espécies de tilápias. No entanto, 80% da produção mundial desses organismos é composta pela tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1) (FAO, 2022). Isso ocorre devido ao desempenho produtivo da espécie, caracterizado por crescimento mais rápido, alto rendimento de filé, facilidade de manejo e outras características zootécnicas superiores às demais espécies de tilápias (Nguyen *et al*., 2021).

**Figura 1 -** Tilápia do Nilo *(Oreochromis niloticus).*



Fonte: Peixe BR, 2024

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a segunda espécie de peixe continental mais produzida globalmente, alcançando um volume total de produção de 5,3 milhões de toneladas em 2022 (FAO, 2024). No cenário mundial, o Brasil se destaca como um dos maiores produtores desse organismo aquático, ocupando a quarta posição, ficando atrás apenas da China, Indonésia e Egito.

No contexto nacional, a tilapicultura consiste em uma das mais importantes fontes de produção piscícola, tendo uma produção no último ano de 579.080 toneladas, representando 65,3% de toda a produção aquícola do país (Peixe BR, 2024). A produção de tilápias no Brasil é mais expressiva nas regiões Sul e Sudeste, com destaque para o estado

do Paraná, que produziu 209.500 toneladas em 2023. Outros estados de grande produção são São Paulo, com 75.700 t, e Minas Gerais, com 58.200 t (Peixe BR, 2024). Refletindo a importância da tilapicultura nessas áreas para o mercado brasileiro e internacional.

## 2. ÓLEOS ESSENCIAIS COM COMPOSTOS BIOATIVOS

Os óleos essenciais são compostos voláteis complexos derivados de plantas aromáticas. Sua extração pode ser feita de diversas partes das plantas, incluindo raízes, caules, folhas e flores. Os compostos biologicamente ativos presentes nesses óleos são, em sua maioria, metabólitos secundários (derivados do metabolismo primário do carbono), lipofílicos, líquidos ou voláteis. Estes compostos pertencem a grupos químicos como terpenóides, fenóis, glicosídeos e alcalóides, que englobam álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, lactonas, entre outros (Huyghebaert; Ducatelle; Immerseel, 2011; Pan *et al*., 2023).

Os OEs são metabólitos vegetais secundários que em alguns grupos possuem uma variedade de compostos bioativos, como polifenóis, álcoois orgânicos, terpenos, cetonas e ésteres (Pan *et al*., 2023). Esses componentes desempenham papéis fundamentais em várias funções fisiológicas e bioquímicas quando suplementados na dieta de peixes, particularmente na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Na produção animal, os compostos bioativos dos óleos essenciais podem ter diversos modos de ação, podendo agir no controle de patógenos através da sua atividade antimicrobiana e antioxidante (Pan *et al*., 2023). Além disso, melhoram a digestão por meio da estimulação da atividade enzimática e da absorção de nitrogênio, também atuam no fortalecimento do sistema endócrino e apresentam propriedades antivirais e anti-inflamatórias (Androutsopoulou *et al*., 2021; Sidiropoulou *et al*., 2022).

A adição dos compostos bioativos de determinados OEs às rações pode aumentar a produção do suco pancreático, que estimula a secreção de enzimas digestivas como a quimiotripsina, tripsina, carboxipeptidase, além de modular a microbiota intestinal, exercer endócrinos e apresentar atividades antibacterianas e antivirais, contribuindo também para a resposta imunológica, com efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Basmacioglu *et al*., 2010; Dawood *et al*., 2022b).

A incorporação de óleos essenciais tem demonstrado benefícios significativos no crescimento dos peixes. Estudos indicam que a inclusão de óleos essenciais na dieta pode resultar em aumento de peso e comprimento dos peixes (Aanyu; Betancor; Monroig, 2018;

El-Hawarry; Mohamed; Safinaz, 2018; Sousa *et al*., 2020). A suplementação com cinamaldeído e timol isolados nas dosagens de 1 e 2ml/kg pelo período de 75 dias, por exemplo, levou a um aumento de ganho em peso em tilápia-do-Nilo, quando administ rada nas doses apropriadas (Amer; Metwally; Ahmed, 2018).

Outros estudos também relataram melhorias no crescimento e no desempenho produtivo quando se utilizaram óleos essenciais isolados de manjericão-cravo e gengibre nas dosagens de 0,5, 1,0 e 1,5% por 55 dias (Brum *et al*., 2017). A inclusão dos óleos essenciais de capim-limão e gerânio-rosa nas dosagens de 200 e 400 $mg/kg^{-1}$, por exemplo, mostrou potencial para melhorar o estado oxidativo, as respostas imunológicas e a resistência a doenças em *Oreochromis niloticus* no tratamento de 12 semanas (Al-Sagheer *et al*., 2018). Além disso, o uso de óleos essenciais pode aumentar o número de células caliciformes e melhorar a morfologia intestinal, o que é essencial para a absorção de nutrientes e a defesa contra patógenos (Moreira *et al*., 2018; Zeppenfeld *et al*., 2016).

Na modulação intestinal, os óleos essenciais influenciam a microbiota intestinal dos peixes, promovendo um equilíbrio saudável entre bactérias benéficas e patogênicas. Isso resulta em um aumento na atividade de bactérias benéficas e na secreção de enzimas digestivas, o que favorece a digestão eficiente dos nutrientes e inibe o crescimento de bactérias patogênicas (Reverter *et al*., 2014; Zeng *et al*., 2015). O cinamaldeído, por exemplo, atua nos receptores de serotonina no trato gastrointes tinal dos peixes, aumentando o número e o tamanho das pregas intestinais, o que melhora a absorção de nutrientes (Mohamed *et al*., 2014; Lieder *et al*., 2020).

A resposta antimicrobiana dos óleos essenciais é frequentemente atribuída à presença de grupos hidroxila em compostos fenólicos, que interagem com proteínas por meio de pontes de hidrogênio e interações iônicas e hidrofóbicas (Abreu *et al*., 2020). Além disso, eles podem reduzir a concentração interna de ATP sem um aumento proporcional na concentração externa, resultando em menor síntese ou maior hidrólise de ATP, o que altera a permeabilidade e a integridade da membrana celular bacteriana (Ultee; Bennik; Moezelaar, 2002). Estudos destacam a eficácia do carvacrol e timol contra patógenos bacterianos e a melhora no desempenho produtivo de peixes e frangos quando suplementados com esses compostos (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010; Ahmadifar *et al.*, 2011;

Zheng *et al*., 2009).

Devido suas propriedades antimicrobianas e moduladoras, os óleos essenciais exercem efeitos significativos na microbiota intestinal, isso ocorre uma vez que seus compostos hidrofóbicos são capazes de penetrar nas membranas celulares de microrganismos patogênicos, causando o rompimento das mesmas e levando à lise celular, ou ainda, esses compostos podem alterar a permeabilidade da membrana, interferir na síntese de proteínas e ácidos nucleicos, e inibir a atividade de enzimas essenciais ao metabolismo microbiano (Hoseinifar *et al*., 2018; Abdel; Elhady; Shalaby, 2019; Gholami-Ahangaran; Ahmadi-Dastgerdi; Karimi-Dehkordi, 2020; Bandeira Junior *et al*., 2022; Gholami-Ahangaran *et al*., 2022). Essas ações resultam na redução de populações de microrganismos patogênicos e na promoção de um equilíbrio no ecossistema da microbiota intestinal.

O *blend* de diferentes óleos essenciais pode ter efeitos sinérgicos que potencializa m seus benefícios. O efeito sinérgico pode melhorar a imunidade, a histomorfologia intestina l, a digestão e o rendimento em peso dos peixes. Estudos mostram que a suplementação com óleos essenciais pode resultar em um aumento significativo na área de absorção intestina l, promovendo um crescimento mais rápido e uma melhor conversão alimentar (Roques *et al*., 2020; Magouz *et al*., 2021; Pan *et al*., 2023).

Dentre os óleos essenciais estudados na nutrição de peixes, o óleo de orégano (*Origanum vulgare*) tem como principal princípio ativo o carvacrol, presente em 60% do óleo de orégano (Nostro; Papalia, 2012). O tomilho (*Thymus vulgaris*), que tem como principal princípio ativo o timol (Marchese *et al*., 2016) e a canela (*Cinnamomum verum*) com o ácido cinamaldeído como principal princípio ativo, tem sido avaliado devido aos seus importantes efeitos apresentados para esses organismos (Ranasinghe *et al*., 2013). Resultados positivos em resposta ao uso desses óleos essenciais para animais têm sido observados através da associação de óleos essenciais, possivelmente devido ao sinergis mo das ações geradas pelo *blend* desses compostos. Isso ocorre quando o efeito de duas substâncias em conjunto é superior a soma de seus efeitos separados na mesma dose.

No estudo *in vitro* realizado por Zhou *et al*. (2006), foram testadas 12 combinações dos compostos carvacrol, timol e cinamaldeído em bactérias *S. Typhimurium,* onde sete combinações apresentaram efeito sinérgico significativo na redução do crescimento

bacteriano, o efeito sinérgico foi conquistado a partir das combinações de cinamald e ído (100 mg/L) + timol (100 mg/L), cinamaldeído (100 mg/L) + carvacrol (100 mg/L), timol (200 mg/L) + carvacrol (100 mg/L) e timol (100 mg/L) + carvacrol (200 mg/L).

Na pesquisa realizada por Pei *et al*. (2009) apresentou a sinergia do uso de carvacrol (200mg/L) e cinamaldeído (200 mg/L) quando testada no crescimento de *E. colli.* Entretanto, o estudo realizado por Ruá *et al.* (2019) utilizando o carvacrol em associação com o timol, nas concentrações de 1043,24 ± 379,28 µg/mL houve uma concentração maior para atingir o efeito inibitório de *S. Aureus* indicando um antagonismo desses componentes, enquanto em concentrações menores, sendo de 384,21±78,40 µg/mL de carvacrol e 511,84 ± 299,76 µg/mL *de* timol obtiveram o mesmo efeito inibitório para a espécie bacteriana em estudo.

O cinamaldeído é utilizado na produção piscícola como um potencial inibidor bacteriano em concentrações inferiores a 500 µg/mL, tem demonstrado forte atividade antibacteriana contra diversas cepas de bactérias. Segundo o estudo de Bandeira Junior *et al.* (2022), o composto mostrou eficácia no combate a patógenos como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus, Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*, reforçando seu potencial como uma alternativa natural no controle de infecções bacterianas em diversos contextos.

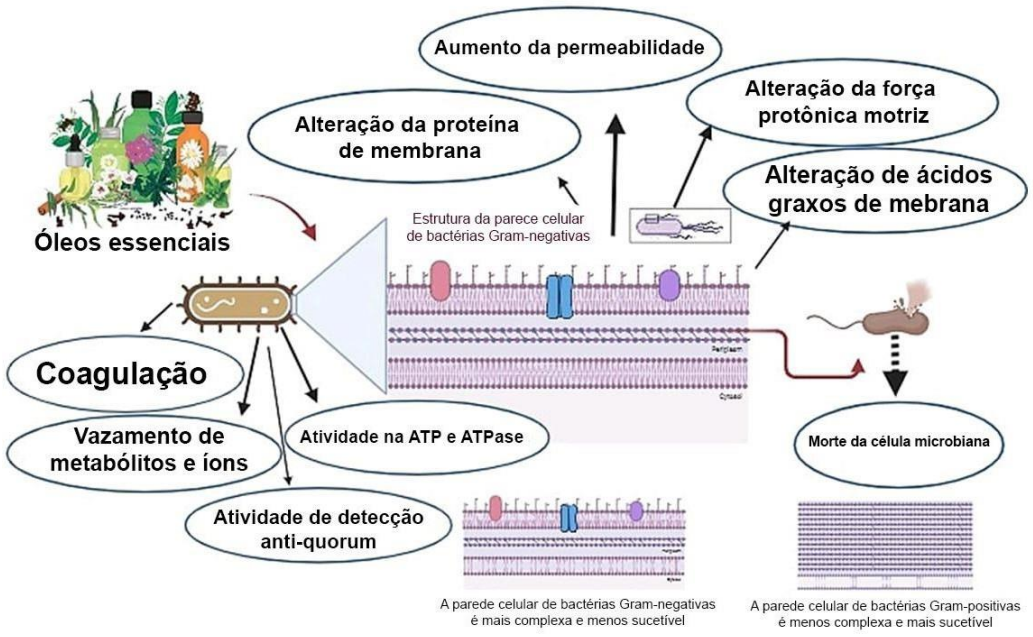
Os óleos essenciais contêm uma complexa mistura de compostos bioativos, como terpenos, fenóis, aldeídos e álcoois, que atuam por diferentes mecanismos contra as bactérias (Malathy; Ajitha; Thampy, 2021). Esses compostos podem interagir com as membranas celulares bacterianas, alterando sua permeabilidade ao interferirem nos gradientes de íons hidrogênio e potássio, levando à desnaturação e coagulação de proteínas e à ruptura celular. Essa modificação compromete processos celulares essenciais, como o transporte de elétrons, a translocação de proteínas, etapas de fosforilação e outras reações enzimáticas, resultando na perda do controle quimiosmótico e, eventualmente, na morte da bactéria (Pu *et al*., 2020).

Além disso, os óleos essenciais inibem enzimas bacterianas essenciais e interferem em processos metabólicos importantes para a sobrevivência dos microrganismos. A combinação

desses efeitos confere aos óleos essenciais um potencial antimicrobiano contra uma ampla gama de patógenos, com graus variados de seletividade. Sua capacidade de romper as paredes celulares bacterianas, deve-se à sua natureza lipofílica, que facilita sua acumulação nas membranas (Dorman; Deans, 2000; Giannenas *et al*., 2013; Amer; Metwally; Ahmed, 2018).

Observa-se que as bactérias Gram-positivas geralmente são mais sensíveis aos óleos essenciais do que as Gram-negativas (C *et al*., 2014; Mancuso *et al*., 2019). Isso pode acontecer devido às diferenças na estrutura da parede celular entre esses dois grupos de bactérias. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa adicional de lipopolissacarídeo que pode oferecer maior proteção contra a penetração dos compostos ativos dos óleos (Figura 2).

**Figura 2** – Estrutura das paredes bacterianas de GRAM-positivas e GRAM-negativas.




Fonte: Adaptada de Lupia *et al*., 2024.

A seletividade também varia conforme a espécie de planta da qual o óleo é extraído e sua composição química específica. O estudo relizado por Klaus *et al*. (2009) apresentou que os óleos extraídos de *Thymus vulgaris* e *Majorana hortensis* foram particularmente eficazes contra cepas de *Listeria monocytogenes*, enquanto a análise de Salih *et al.* (2019) apresentou

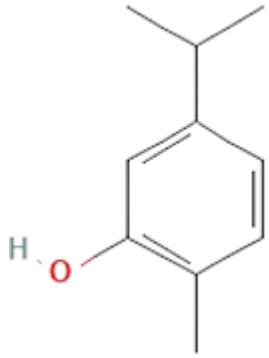
que o óleo extraído de *Nigella sativa* apresentou uma potente ação contra *Staphylococcus aureus* resistente. A seletividade dos óleos essenciais por bactérias patogênicas pode ocorrer através do resultado da interação complexa entre a composição química única de cada óleo e as características estruturais e fisiológicas específicas de cada espécie bacteriana (Zeshan, 2023).

Os óleos essenciais (OEs) possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamató r ias atribuídas à presença de compostos terpenóides e fenólicos que podem ser encontrados no carvacrol, timol e ácido cinamaldeído, que podem modular vias metabólicas específicas, resultando em efeitos benéficos (Veronezi *et al*., 2022). Esses compostos inibem a ativação do fator de transcrição NF-κB, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e, consequentemente, a resposta inflamatória (Bastos *et al*., 2009). Além disso, os OEs podem aumentar a atividade de enzimas antioxidantes endógenas, como a superóxido dismutase e a catalase, que neutralizam espécies reativas de oxigênio, protegendo as células do estresse oxidativo (Bastos *et al*., 2009; Pereira *et al*., 2021). A lipofília dos OEs permite sua interação com membranas celulares, promovendo a integridade celular e modulando respostas inflamatórias (Dorman; Deans, 2000).

## 2.1. CARVACROL

O orégano (*Origanum vulgare L.)* é uma planta da família Lamiaceae, nativa das regiões Euro-Siberiana e Irano-Siberiana, e é amplamente encontrada na área do Mediterrâneo. Contém substâncias com princípios ativos, como o carvacrol (Figura 3), um fenólico líquido conhecido como 2-metil-5-(1-metiletil) -fenol, um monoterpeno. Esta planta perene é bastante ramificada, possui hastes arroxeadas e pode atingir entre 30 e 90 centímetros de altura. No Brasil, é cultivada extensivamente nas regiões Sul e Sudeste, principalmente para uso culinário, mas também favorecendo sua utilização em dietas na nutrição animal (Nostro; Papalia, 2012).

**Figura 3** – Estrutura molecular do carvacrol




Fonte: PubChen

A literatura científica reconhece as propriedades benéficas do óleo de óregano para a saúde humana e animal , isso ocorre principalmente devido suas atividades antimicrobianas (Sivropoulou *et al*., 1996; Lambert *et al*., 2001; Chavan; Tupe, 2014), imunológicas (Maiorka; Dahlke; Morgulis, 2006; Hashimi & Davoodi, 2010; Khazdair *et al*., 2018), digestivas (Çabuk *et al*., 2006), antioxidantes (Botsoglou *et al*., 2002; Maia, 2007; Khazdair *et al*., 2018), inseticidas (Karpouhtsis *et al*., 1998), antiviral (Sánchez *et al*., 2015), antifúngicas (Souza *et al*., 2005; Chavan; Tupe, 2014) e anti-canceríge no (Zeytun; Ozkorkmaz, 2021). O carvacrol ainda pode reduzir a dose efetiva de antibiót icos quando usado em conjunto, podendo minimizar os efeitos adversos dos medicame ntos (Gholami-Ahangaran; Ahmadi-Dastgerdi; Karimi-Dehkordi, 2020). Tais atividades são atribuídas ao carvacrol, timol e seus precursores ɣ-terpineno e ρ-cimeno.

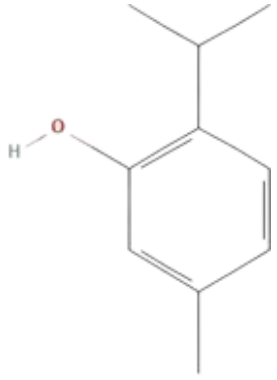
O carvacrol, é um composto lipofílico presente no orégano que atua como agente bactericida. Isso acontece devido a sua afinidade pela camada de lipopolissacarídeos (LPS) presente na membrana externa bacteriana. O mecanismo de ação do carvacrol envolve a modificação da permeabilidade das membranas celulares bacterianas, resultando na desestruturação e despolarização tanto das membranas celulares quanto das mitocondria is, ocasionando danos às proteínas da membrana, perda de íons e metabólitos essenciais, culminando na morte bacteriana (Lambert *et al*., 2001; Solórzano-Santos; Miranda-Novales, 2012; Gholami-Ahangaran *et al*., 2022). Além de suas propriedades antimicrobianas, o carvacrol proporciona benefícios adicionais para animais de produção.

Pesquisas demonstraram que a incorporação do OE de orégano na dieta animal pode aprimorar a conversão alimentar, aumentar a digestibilidade dos nutrientes e promover o equilíbrio da microbiota intestinal. Estes efeitos contribuem para a redução da adesão de bactérias patogênicas no epitélio intestinal, resultando em uma melhoria na saúde geral e no desempenho dos animais (Jamroz; Kamel, 2002). O carvacrol, ainda, melhora a conversão alimentar em animais de produção, aumentando a digestibilidade dos nutrient es e equilibrando a microbiota intestinal, reduzindo a adesão de bactérias patogênicas no epitélio intestinal (Jamroz; Kamel, 2002).

## 2.2. TIMOL

O tomilho (*Thymus vulgaris*) também tem sido amplamente pesquisado para a extração de seus óleos essenciais. Nativo da Europa e encontrado em áreas ao redor do Mediterrâneo, o tomilho apresenta hastes lenhosas na base e herbáceas na ponta, com ramos eretos e aveludados de cor branca, folhas verde-acinzentadas pontilhadas na face superior e flores róseas e brancas (Martins *et al*., 2000). O principal composto ativo do tomilho é o timol (2-isopropil-5-metilfenol) (Figura 4), um monoterpeno fenólico e isômero do carvacrol, conhecido por suas propriedades antioxidantes, antissépticas, antifúngicas, antibacterianas e por estimular o sistema digestivo e aumento de crescimento na produção animal (Marchese *et al*., 2016; Aanyu; Betancor; Monroig, 2018).

**Figura 4 –** Estrutura molecular do timol.




Fonte: PubChen.

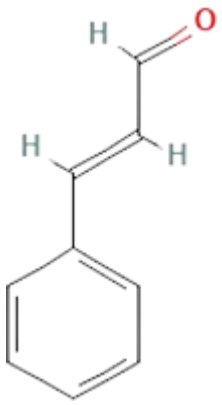
O timol é o monoterpeno dominante nos óleos essenciais extraídos das plantas da família *Lamiaceae*, incluindo os gêneros *Thymus, Ocimum, Origanum, Satureja, Thymbra e Monarda*, sendo amplamente disponível na natureza (Marchese *et al*., 2016). Durante séculos o timol foi utilizado na medicina tradicional e apresentou grande propriedade farmacológica, com atividades anti-oxidantes, anti-inflamatórias, antibacteria nas, analgésicas, antiespasmódicas, antifúngicas e antitumorais (Gholami-Ahangaran *et al*., 2022). Atualmente, o timol é utilizado em diversas aplicações funcionais nos setores farmacêutico, alimentício, cosmético e nutracêutico, com estudos apontando seu potencial terapêutico no tratamento de distúrbios respiratórios, nervosos, cardiovasculares, além de feridas e problemas de pele (Salehi *et al*., 2018).

Como anti-inflamatório, o timol atua inibindo o recrutamento de citocinas e quimiocinas pré-inflamatórias. Seus efeitos antioxidantes são decorrentes da eliminação de radicais livres, do aumento de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos endógenos e da quelação de íons metálicos (Gholami-Ahangaran; Azizi; Rangsaz, 2016). Em relação aos lipídios, o timol aumenta os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e diminui os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), estabilizando a membrana. De origem natural, o timol se mostra um potencial terapêutico promissor (Gholami-Ahangaran *et al*., 2022).

## 2.3. ÁCIDO CINAMALDEÍDO

O cinamaldeído (3-fenil-2-propenol) (Figura 5) é outro composto ativo amplame nte utilizado em *blend* com óleos essenciais. Pertencente ao grupo dos fenilpropanóides. A canela- verdadeira (*Cinnamomum zeylanicum*) e a canela- chinesa (*Cinnamomum cassia*) são árvores da família Lauraceae, cujas cascas são amplamente utilizadas como especiaria na culinária devido ao seu aroma marcante.

**Figura 5** – Estrutura molecular do ácido cinamaldeído




Fonte: PubChen

O OEs extraído da *C. zeylanicum* oferece diversos benefícios à saúde humana, como atividades antimicrobianas e antiparasitárias, redução dos níveis de glicose e pressão sanguínea, diminuição do colesterol sérico, inibição da agregação da proteína tau e formação de filamentos (associados à doença de Alzheimer), efeitos inibitórios na osteoclastogênese, propriedades anti-secretagogas e antiulcerosas gástricas, além de atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, cicatrização de feridas e efeitos hepatoprotetores (Ranasinghe *et al*., 2013; Bandeira Junior *et al*., 2022).

Este princípio ativo tem demonstrado eficácia antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias e fungos (Chen *et al*., 2021), incluindo espécies como *Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Aspergillus ochraceus, Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus terreus* (Ranasinghe *et al*., 2013). O cinamalde ído ainda, é um importante antioxidante natural (Zhao *et al*., 2023), pesquisas demonstrara m que esse ácido desempenha um papel importante no combate de doenças metabólicas, regula o metabolismo lipídico e o metabolismo do fígado em humanos (Neto *et al*., 2020).

No trato gastrointestinal de peixes, o ácido cinamaldeído atua como receptor de serotonina, age na modulação intestinal, aumentando o número e tamanho das vilosidades, contribuindo para uma melhor absorção de nutrientes (Gupta; Khan; Khan, 2021). Ainda, é responsável pelo aumento de secreção de glicoproteínas, permitindo a modulação da microbiota intestinal e inibindo o crescimento de patógenos (Abdel; Elhady; Shalaby,

2019). Apesar das diversas propriedades farmacológicas conhecidas do cinamaldeído, eles ainda são pouco estudados na aquicultura, especialmente em relação a seus efeitos antibacterianos, anestésicos, promotores de crescimento e antioxidantes. Além disso, os compostos hidrofóbicos dos óleos essenciais (OEs) podem penetrar nas células bacterianas e parasitárias, causando deformidades e disfunções celulares (Hoseinifar *et al*., 2018; Bandeira Junior *et al*., 2022).

## 2.4. LIOFILIZAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO DOS COMPOSTOS DE OEs

A aplicação de técnicas de liofilização e microencapsulação aos compostos carvacrol, timol e ácido cinamaldeído, isolados e em *blend*, antes de sua incorporação na ração comercial para peixes, representa uma abordagem atual na suplementação de aditivos naturais na aquicultura (Silva; Silva, 2020). A liofilização, remove a água dos compostos bioativos sob baixa temperatura e pressão, preservando suas propriedades químicas e biológicas. Posteriormente, a microencapsulação envolve a cobertura desses compostos com materiais protetores, formando microcápsulas que protegem os ingredientes ativos de fatores ambientais adversos, como luz, oxigênio e variações de pH, além de mascarar sabores indesejáveis e controlar a liberação dos compostos no trato gastrointestinal dos peixes (Farias, 2023).

Essa abordagem é fundamental para manter a estabilidade e a eficácia dos compostos bioativos durante o processamento da ração e o armazenamento, garantindo que suas propriedades benéficas sejam preservadas até o momento da ingestão pelos peixes. A microencapsulação também permite a liberação controlada e direcionada dos compostos no organismo, otimizando sua absorção e eficácia (Silva; Silva, 2020). Além disso, essa técnica minimiza a volatilidade e a reatividade dos compostos, aumentando sua estabilidade e prolongando a vida útil do produto final (Freitas, 2022).

## 3. METAGENÔMICA

Metagenômica é a denominação da análise genômica das comunidades de microrganismos presentes em um ambiente específico. Este campo de pesquisa visa identificar as populações de microrganismos em um microbioma e compreender suas funções dentro desse ecossistema. Por meio de técnicas avançadas de sequenciamento e bioinformática, a metagenômica permite uma compreensão da diversidade microbia na complexa e suas interações, contribuindo para o conhecimento do funcionamento do microbioma e suas aplicações biotecnológicas (Forcina *et al*., 2022). Assim, a metagenômica tem se tornado essencial para o ecossistema da microbiota, uma vez que permite uma compreensão mais aprofundada do papel ecológico, do metabolismo e da história evolutiva dos microrganismos. Os avanços tecnológicos têm gerado uma produção massiva de dados de sequências de nucleotídeos com um custo mais baixo no sequenciamento de nova geração. (Kim *et al*., 2013).

Para determinar populações bacterianas têm sido utilizados métodos de amplificação da codificação de fragmentos para 16S rRNA, essa técnica surgiu como uma poderosa ferramenta para determinar a diversidade genética de comunidades microbia nas. A região 16S pode codificar tRNAs dependendo da espécie bacteriana, apresenta heterogeneidade significativa no comprimento e na sequência de nucleotídeos, tendo sido usado de forma extensiva para identificar e distinguir cepas bacterianas e espécies relacionadas (Forcina *et al*., 2022; Jensen *et al*., 1993; Scheinert *et al*., 1996; Aubel *et al*., 1997; Maes *et al*., 1997).

A identificação de cada sequência individual é fundamental na análise de comunidades microbianas, uma vez que as informações taxonômicas permitem inferir os papéis ecológicos dos microrganismos em um ambiente. Diversos métodos são utilizados para atribuir taxonomia microbiana com dados de sequência de alto rendimento, sendo o BLAST um dos algoritmos mais amplamente utilizados para a classificação de sequências. Resultados principais do BLAST pesquisados em bancos de dados de referência, como RDP, SILVA, *Greengenes* e *EzTaxon-e*, são comumente usados para identificação taxonômica (Cole *et al*., 2009; De Santiz *et al*., 2006; Kim *et al*., 2012).

A metagenômica vem progredindo significativamente na compreensão da ecologia

do microbioma, impulsionada pelos avanços nas plataformas de sequenciamento, apesar de não responder a todas as questões, é uma ferramenta essencial para investigar a diversidade e função microbiana (Kim *et al*., 2013). A complexa e a vasta quantidade de dados dessa ferramenta ainda são desafios. No entanto, espera-se um uso mais comum da metagenômica no futuro, as ferramentas e bases de dados metagenômicos ainda estão no começo, mas é estimado um crescimento importante e uma revolução na bioinformát ica metagenômica (Forcina *et al*., 2022).

## 3.1. MICROBIOTA INTESTINAL DOS PEIXES

A microbiota é formada a partir de uma comunidade microbiana complexa e diversificada composta por bactérias, arquéias, vírus e fungos que habita um ambiente específico (Vorste; Sarremejane; Datry, 2020). Por sua vez, o microbioma refere-se ao conjunto de genes desses microrganismos e como eles são influenciados por fatores ambientais. A maioria desses microrganismos está presente no trato gastrointestinal dos peixes (Sender; Fuchs; Milo, 2016), desempenhando um importante papel na manutençã o da saúde do hospedeiro e na prevenção de doenças por meio da produção de metabólitos microbiológicos (Schroeder; Bäckhed, 2016; Thursby *et al*., 2017). Fatores como: dieta, genética, estresse e estressores ambientais podem moldar significativamente as comunidades microbiológicas do organismo hospedeiro.Por este motivo, a pesquisa da microbiota de peixes passou a ganhar força na aquicultura visando melhorar a saúde e o desempenho produtivo desses organismos (Schryver *et al*., 2012; Adamovsky *et al*., 2018; Hoseinifar *et al*., 2024).

Estudos para identificar a composição dessa microbiota foram feitos durante anos por meio de cultura, esses métodos, porém não conseguiam identificar a tamanha diversidade microbiológica da microbiota intestinal, por este motivo, estudos molecula res vêm sendo desenvolvidos desde os anos 2000, para compreender e identificar a composição dos microbiomas.

A microbiota intestinal dos peixes se diferencia da microbiota humana, uma vez que a composição da microbiota dos peixes e sua densidade são semelhantes no intestino proximal e distal. Ainda há pouca informação disponível sobre o microbioma dos peixes e

sua importância quando comparado aos vertebrados terrestres (Hoseinifar *et al*., 2019). Entretanto, os estudos sobre a microbiota intestinal de peixes começaram a ser mais aprofundados quando houve a confirmação de que essa microbiota desempenha um papel fundamental no estímulo e modulação do desenvolvimento gastrointestinal. Essa interação contribui mantendo a tolerância da mucosa intestinal, promovendo a imunomodulação e melhorando a capacidade do organismo em enfrentar patógenos e doenças. A presença de uma microbiota equilibrada contribui significativamente para o aumento da resposta imunológica em peixes, permitindo que eles se defendam de infecções e estresses ambientais (Hoseinifar *et al*., 2017).

A comunidade microbiana intestinal se desenvolve durante o início da vida. A microbiota pioneira possui uma grande influência no estágio inicial da vida das larvas de peixes, podendo definir a aptidão e o desenvolvimento desses organismos por um longo prazo durante o desenvolvimento. Na produção piscícola a colonização microbiana no TGI (trato gastrointestinal) é afetado pela ingestão de microrganismos presentes na área de criação e na ração, expondo os peixes a diferentes microrganismos e modulando a composição da microbiota intestinal. Deng *et al*. (2021) em seu estudo, verificou que os primeiros microrganismos ambientais que colonizam o intestino, quando a boca se abre durante o desenvolvimento larval, possuem um impacto mais forte na comunidade procariota que se desenvolve no intestino, do que microrganismos que colonizam um intestino maduro, neste estudo ainda, foi possível observar que um microbioma central permaneceu durante todo experimento composto por Cetobacterium, *Plesiomonas* e *Escherichia-Shigella*.

Estudos baseados em cultura bacteriana com o intuito de caracterizar a microbiota de forma fisiológica e bioquímica eram demorados e imprecisos, além de não ter uma abordagem ampla de espécies, uma vez que mais de 95% das cepas bacterianas não crescem no meio de cultivo (Llewellyn *et al*. 2014; Hoseinifar *et al.*, 2019). Técnicas molecula res surgiram para resolução desse problema, sendo utilizadas para identificar a composição de microbiomas em diferentes espécies de peixes, para isso foi utilizado o sequenciamento de próxima geração do gene 16S rRNA, esse método possibilitou sequenciar a composição taxonômica da microbiota de peixes e compreender a comunidade complexa de bactérias no intestino que até então era desconhecida (Llewellyn *et al*.; 2014; Ringo; Zhou; Gonzalez-

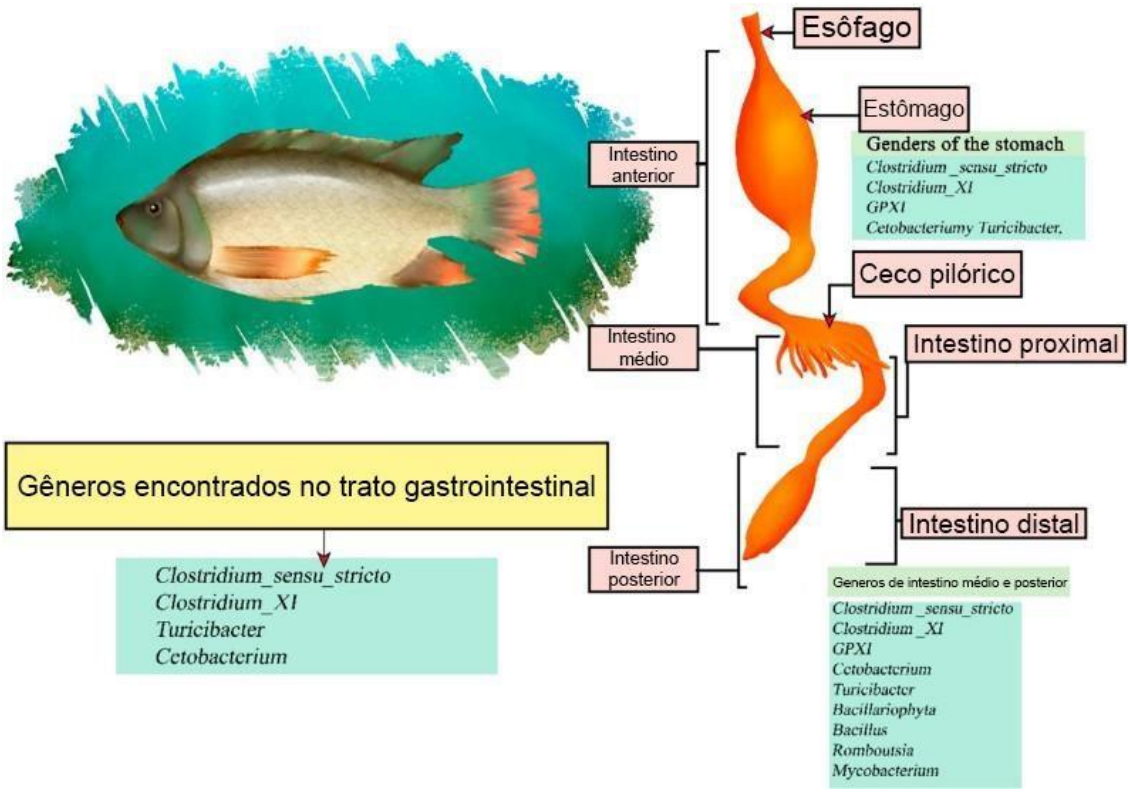
Vecino, 2016).

Atualmente, é amplamente reconhecido que um microbioma intestinal estável e saudável (simbiose) desempenha importantes papéis no funcionamento normal do sistema digestivo e contribui para a sinalização adequado do eixo intestino-cérebro, de maneira geral, o microbioma íntegro ajuda a assegurar a saúde do organismo hospedeiro (Hoseinifar *et al*., 2019; Hoseinifar *et al*., 2024).

O trato gastrointestinal da tilápia do Nilo é composto por esôfago, estômago, ceco pilórico, intestino proximal, médio e distal. Na região do esôfago e estômago, são encontrados uma abundância de gêneros bacterianos como *Clostridium_sensu_stricto*, *Clostridium_XI*, GPXI, *Geobacterium* e *Turicibacter*, sugerindo que esses gêneros podem estar envolvidos na digestão inicial. No intestino médio e posterior, são encontrados gêneros como *Clostridium_sensu_stricto, Clostridium_XI,* GPXI, *Cetobacterium, Turicibacter, Bacillariophyta, Bacillus, Romboutsia* e *Mycobacterium*, apresentando uma maior diversidade em relação ao esôfago e estômago, sugerindo uma função importante da microbiota na absorção de nutrientes, na produção de metabólitos e digestão final (Huaiquipán *et al*., 2023) (Figura 6).

Com hábitos alimentares onívoros e alta plasticidade alimentar, sua dieta é composta por fitoplâncton, zooplâncton, macrófitas e microalgas (Tsegay; Natarajan, 2016). A análise realizada por Phrompanya; Saenphet; Saenphet (2019) identificou que os Filos Proteobacteria e Fusobacteria são os filos centrais da microbiota presente no intestino da tilápia. Esses mesmos autores identificaram que o gênero *Cetobacterium* é predominante no TGI deste organismo, Zhang *et al*. (2022) identificaram uma nova espécie deste gênero nomeada como NK01 com aproximadamente 3 milhões de pares de bases, capaz de produzir aminoácidos como leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, fenilalanina e prolina, sendo que leucina e valina são aminoácidos de cadeia ramificada essenciais para o crescimento e desenvolvimento de peixes e não conseguem ser sintetizados por eles, sugerindo que a cepa NK01 tem uma relevância na suplementação natural para a aquicultura.

**Figura 6** – Microbioma identificado por Huaiquipán et al. (2023) no trato gastrointestinal da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).




Fonte: Adaptada de Huaiquipán et al., 2023.

Devido ao impacto da microbiota intestinal na saúde dos peixes, inúmeros estudos têm sido realizados para caracterizar e entender os mecanismos de ação desses microrganismos e elucidar seus mecanismos de ação. Estudos vem analisando diferentes aspectos da relação da microbiota intestinal e seu organismo hospedeiro, identificando sua composição, suas interações com o hospedeiro e sua influência na digestão e absorção de nutrientes, além da sua função imunológica, revelando que a microbiota intestinal desempenha um importante papel na nutrição e desempenho produtivo desses organismos (Zhang *et al*., 2022; Huaiquipán et al., 2023; Deng *et al*., 2023).

Além da microbiota, os ácidos graxos também foram reconhecidos como fatores importantes que influenciam a saúde dos peixes, uma vez que ácidos graxos poli-insaturados, ômega-3 e ômega-6, podem modular a composição e a atividade da microbiota intestinal.

Estudos apresentaram que esses ácidos graxos influenciam o crescimento de bactérias benéficas, aumentam a integridade da barreira intestinal e regulam as respostas inflamató r ias em peixes (Fracalossi; Cyrino, 2012; Olivares-Rubio; Veja-Lopez, 2016; Xu *et al*., 2022; Sun; Wang; Kan, 2024).

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1. PEIXES E MANEJO

O experimento foi conduzido na piscicultura localizada na Barragem Ponte Nova, em Salesópolis–SP (Figura 7). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Mogi das Cruzes, sob o protocolo N° 011/2019.

**Figura 7** – Piscicultura da Barragem Ponte Nova, Salesópolis-SP.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

### 4.1.1. Dietas experimentais e manejo alimentar

Foram elaboradas cinco dietas experimentais, sendo composta por cinco tratamentos: (1) dieta controle, composta por ração comercial farelada da marca "*GuabiTech"*; (2) dieta suplementada com 0,25% de carvacrol; (3) dieta com 0,25% de ácido cinamaldeído; (4) dieta com 0,25% de timol; e (5) dieta contendo 0,25% de uma mistura (*blend*) dos compostos bioativos (carvacrol, ácido cinamaldeído e timol). Os óleos essenciais, assim como o *blend* do tratamento 5, foram liofilizados e microencapsulados pela empresa "*Hygsistems Ingredientes Indústria e Comércio LTDA*" e incorporados mecanicamente à ração comercial, que contém 55% de proteína bruta. A mesma empresa foi responsável pela formulação da mistura de óleos essenciais do tratamento 5, cuja composição específica é

confidencial devido ao sigilo industrial, impossibilitando a identificação das proporções de cada óleo essencial. A dieta controle foi composta por ração comercial farelada, também com 55% de proteína bruta, conforme as exigências nutricionais da fase testada.

Os óleos foram adicionados nas rações no momento da incorporação do hormônio para reversão sexual para os alevinos de tilápia. Foi incorporado o hormônio 17-metiltestoterona na concentração de 60mg/kg de ração, sendo essa a quantidade de ração utilizada para cada tratamento, em seguida, a ração foi transferida para embalagem de transporte por um período de cinco minutos para todos os tratamentos, visando sincronizar as partículas durante a homogeneização. Posteriormente, as dietas foram pesadas separadamente segundo o tratamento e repetições experimentais. Os peixes foram alimentados seis vezes ao dia (8h00; 10h00; 12h00; 14h00; 16h00 e as 18h00), até a saciedade aparente por um período de 35 dias.

### 4.1.2. Peixes e condições experimentais

Foram instalados 20 tanques hapas de multifilamento com malha de 1 milímetro com capacidade de 1 $m^3$ alojados em um tanque de alvenaria de 300 $m^3$. Para evitar a entrada de predadores, foi instalada uma tela de proteção em todas as hapas do delineame nto experimental (Figura 8). Os tanques eram abastecidos pela água oriunda do Reservatório de Ponte Nova. Foram utilizadas 2400 larvas de tilápias após o início da alimentação exógena, sendo cada unidade experimental composta por 120 peixes.

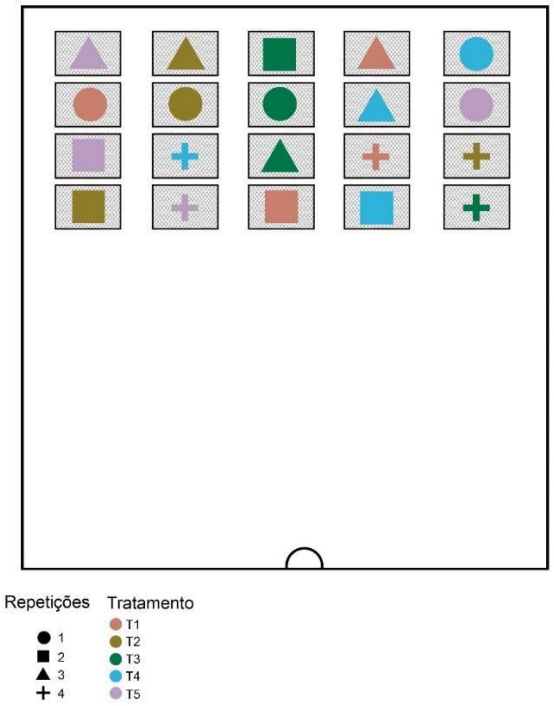
**Figura 8 -** Delineamento experimental



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

O experimento foi composto por cinco tratamentos e quatro repetições, distribuídos em blocos experimentais com variações ao acaso (Figura 9).

***Figura 9*** *– Esquema ilustrativo da disposição dos tratamentos nos tanques hapas*



A oxigenação da água foi mantida por um aerador chafariz (Figura 10). Os parâmetros de pH, condutividade elétrica foram medidos semanalmente, a temperatura foi mensurada diariamente duas vezes ao dia.

**Figura 10 -** Incorporação de oxigênio na água por meio de aerador chafariz



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

### 4.1.3. Coleta de dados

Ao final do experimento todos os peixes foram retirados de cada tanque hapa, anestesiados em benzocaína, na dose de 100 mg.$L^{-1}$ (Gomes *et al*., 2001) para realização das medidas individuais de peso (g) e comprimento total (cm) (Figura 11). Os dados de desempenho produtivo avaliados foram o peso final médio (g); ganho em peso (peso corporal final – peso corporal inicial); ganho em biomassa (biomassa final - biomassa inicial); ganho de peso diário (peso final – peso inicial); número de dias de experimento) ; TCE = 100[(ln peso final médio - ln peso inicial médio) /tempo]; sobrevivênc ia (100(número de peixes final/número de peixes inicial)).

**Figura 11 -** Encerramento do experimento a campo



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

## 4.2. MICROBIOMA INTESTINAL

Para a análise comparativa do microbioma intestinal, três peixes de cada unidade experimental foram eutanasiados em benzocaína, na dose de 250 mg. $L^{-1}$ (Gomes *et al*., 2001), totalizando 60 peixes. Foi coletado o intestino inteiro de cada peixe (Figura 12). O intestino foi congelado imediatamente em gelo seco durante a coleta. Posteriormente, foram conservados em freezer a −80 °C.

**Figura 12** - Coleta de intestino para análise do microbioma



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

As análises do microbioma foram realizadas pela empresa NGS Soluções Genômicas. Para isso, o DNA da metacomunidade foi extraído de cada amostra utiliza ndo o Kit de isolamento de DNA *Zymo Research Fecal* (Irvine, CA; catálogo # D6010). Foi usado o PCR para amplificar a região V4 do gene 16S rRNA (Kumar *et al*., 2014). Todos reagentes de PCR e parâmetros de ciclagem foram utilizados como descrito anteriorme nte (Kumar *et al*., 2014).

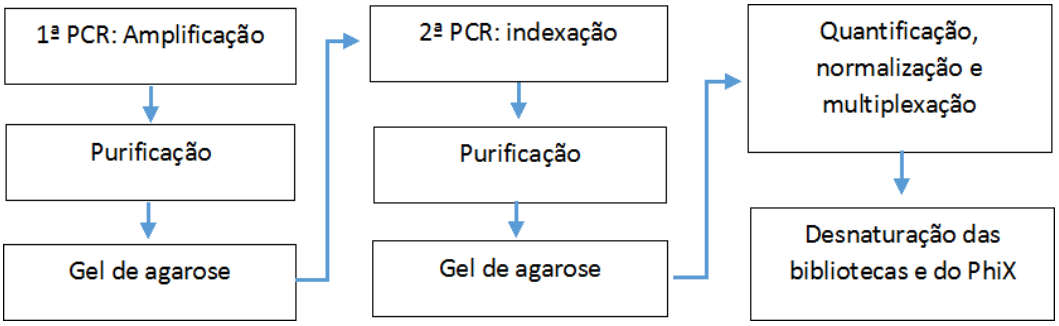
O preparo das bibliotecas foi realizado seguindo as recomendações *Illumina* (Figura 13) (Pichler *et al*., 2018). Os *primers* utilizados para amplificação locus-específica de bactérias flanqueiam a região V4, com sequência *overhang* de adaptadores incluída nos *primers* locus-específicos. As sequências de adaptadores *Illumina*, que foram hibridizadas com as sequências imobilizadas na lâmina de sequenciamento são:

Forward overhang: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[sequência locus-específica]

Reverse overhang: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[sequência locus-específica]

O sequenciamento foi realizado no sistema *Illumina Miseq*, conforme descrito na Figura 12, e as leituras produzidas foram de 2x250 pb.

**Figura 13 –** Sequenciamento no *Illumina Miseq*




A primeira PCR foi realizada para amplificação locus-específica. Em seguida, *AMPure XP beads* foram utilizadas para purificação da reação de PCR, e o tamanho dos fragmentos gerados na reação de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose. A segunda PCR foi realizada para ligar os barcodes do kit *Nextera XT*, e novas etapas de purificação da PCR e validação das bibliotecas foram realizadas. Posteriormente, as bibliotecas foram quantificadas, para que todas as amostras/bibliotecas fossem unidas de maneira equimolar em um único *pool*.

Para introduzir complexidade ao sequenciamento, um controle heterogêneo, o fago *phi-X*, foi combinado com o *pool* de amplicons. Por fim, foi feita a desnaturação das bibliotecas e do *phi-X*, para permitir o sequenciamento.

## 4.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

### 4.3.1. Desempenho produtivo

Para os dados de desempenho produtivo, as variáveis dependentes coletadas e armazenadas no banco de dados foram submetidas ao teste de Normalidade Shapiro-Wilk, teste de Bartlet para verificar homocedasticidade dos erros das. Por meio desses testes é possível assegurar que os pressupostos para realização dos testes de comparação de médias foram atendidos, sendo esses testes a Análise de Variância (ANOVA), realizada com o programa estatístico SAS, 9.4.

### 4.3.2. Microbioma intestinal

Os dados foram analisados conforme previamente publicado (Callahan *et al*., 2016), usando um conjunto de pacotes implementados na linguagem R (Team, 2019) e disponíve is através do projeto BioConductor (Gentlemanm *et al*., 2004; Huber *et al*., 2015).

*Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses*

Primeiro, as leituras multiplexadas foram atribuídas em amostras biológicas. O programa DADA2 (Callahan *et al*., 2016), um pacote de código aberto implementado na linguagem R, foi utilizado para modelagem e correção de erros de amplicons, sem a construção de *Operational Taxonomic Units* (OTUs). Estudos mostram que, em várias comunidades simuladas, DADA2 identificou variantes mais reais e produziu menos sequências espúrias que outros métodos (Callahan *et al*., 2016). O pacote DADA2 tem um pipeline completo implementado para transformar os arquivos fastq do sequenciador em sequências de amostras inferidas, desmembradas e sem quimeras.

A filtragem de arquivos fastq foi realizada para cortar as sequências dos primers de PCR e filtrar as extremidades 3' das leituras devido ao decaimento da qualidade (Q<30), mas mantendo a sobreposição para posterior junção das leituras e remontagem do fragmento da região V4. O algoritmo DADA2 faz uso de um modelo de erro paramétrico e cada conjunto de dados de amplicon tem um conjunto diferente de taxas de erro. O método *learnErrors* aprende esse modelo de erros a partir dos dados, alternando a estimativa das taxas de erro e a inferência da composição da amostra até que eles convergem em uma solução consistente. Como em muitos problemas de aprendizado de máquina, o algoritmo deve começar com um palpite inicial, para o qual são usadas as taxas de erro máximas possíveis nesses dados (as taxas de erro se apenas a sequência mais abundante estiver correta e o restante for erro). Depois, a etapa de desreplicação (denoising) é realizada para se obter uma lista detalhada de sequências únicas e suas abundâncias, e produzir pontuação de qualidade de posição do consenso para cada sequência única, tomando a média das qualidades posicionais das leituras componentes.

DADA2 não cria OTUs e diferencia as variáveis de sequência relacionadas. Diferentemente de outros, esse pipeline realiza a fusão de paired-end reads após a etapa

denoising. Isso ocorre porque o algoritmo de denoising do núcleo usa a relação empírica entre o índice de qualidade e as taxas de erro, atingindo maior precisão através do desmembramento antes da fusão, embora com algum custo computacional. Como a fusão ocorre após a etapa de denoising, é necessária sobreposição exata, sem mismatches, uma vez que se espera que quase todos os erros de substituição já tenham sido removidos. Em seguida, quimeras são removidas.

Após o processamento inicial dos dados de sequenciamento pelo DADA2, as taxonomias foram atribuídas a cada ASV (do inglês *Amplicon Sequencing Variants*) utilizando uma implementação do programa DADA2 do método de classificador bayesiano ingênuo para essa finalidade (Wang *et al*., 2007). A função assignTaxonomy toma como entrada um conjunto de sequências (ASVs) a serem classificadas e um conjunto de treinamento de sequências de referência com taxonomia conhecida, e atribui taxonomias. O banco de dados SILVA foi utilizado como referência (Glöckner *et al*., 2017).

As classificações taxonômicas geradas pelo DADA2, e suas quantificações, foram importadas para o programa phyloseq (McMurdie *et al*., 2013), também implementado no R. O pacote phyloseq é uma ferramenta para importar, armazenar, analisar e exibir graficamente dados complexos de sequenciamento filogenético que já foram agrupados em ASVs. Este pacote aproveita muitas das ferramentas disponíveis em R para ecologia e análise filogenética como VEGAN (Dixon, 2003), ade (Dray *et al*., 2007), ape (Paradis & Schlip 2019), Picante (Kembel *et al*., 2010), enquanto também usa sistemas gráficos avançados e flexíveis do ggplot2 (Wickham, 2019), para produzir facilmente gráficos de alta qualidade. As análises de diversidade Alfa e Beta foram realizadas no pacote phyloseq, conforme descrito em (Callahan *et al*., 2016). Foram filtradas as ASVs que não foram classificadas em pelo menos até o nível de família, e ASVs assinaladas como a mesma espécie foram aglomeradas. Após a aplicação destes filtros, foram obtidas as tabelas de contagens brutas de abundância e de abundância relativa.

Em seguida, as contagens taxonômicas contidas no objeto phyloseq foram importadas para o pacote edgeR (Robinson *et al*., 2010) para normalização dos tamanhos das bibliotecas de cada amostra (Robinson & Oshlack, 2010), subsequentemente as contagens foram transformadas para o logaritmo base 2 das contagens por milhão (logCPM) de cada amostra (transformação voom) (Law *et al*., 2014). Estas transformações permitem que os

modelos lineares implementados no pacote limma (Ritchie *et al*., 2015) sejam usados na análise de abundância diferencial. Finalmente, após o ajuste do modelo linear com limma, a abundância taxonômica diferencial foi testada para cada contraste (par de tratamentos) com testes t moderados (Smyth *et al*., 2004). Essa abordagem soluciona simultaneame nte os problemas de (1) bibliotecas de sequenciamento de DNA de tamanhos amplame nte diferentes e (2) proporções de contagem de ASVs que variam mais do que o esperado em um modelo de Poisson.

# 5. RESULTADOS

## 5.1. DESEMPENHO PRODUTIVO

Durante o período experimental, foram observados valores médios de 26,45±1,41°C para a temperatura; 5,04±0,48 mg.$L^{-1}$ para oxigênio dissolvido; 7,33±0,23 para o pH; 110, 41±6,39 µS.$cm^{-1}$ para a condutividade elétrica da água. Os peixes alimentados com as dietas contendo os compostos isolados e em *blend* não influenciaram (P>0,05) o desempenho produtivo dos animais para os parâmetros avaliados (Tabela 1).

**Tabela 1 –** Desempenho produtivo de alevinos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo óleos essenciais. (1) Dieta controle (ração comercial); (2) dieta com 0,25% de óleo essencial orégano; (3) dieta com 0,25% de óleo essencial de canela; (4) dieta com 0,25% de óleo essencial de tomilho e (5) composto de óleos essenciais (orégano, canela e tomilho).

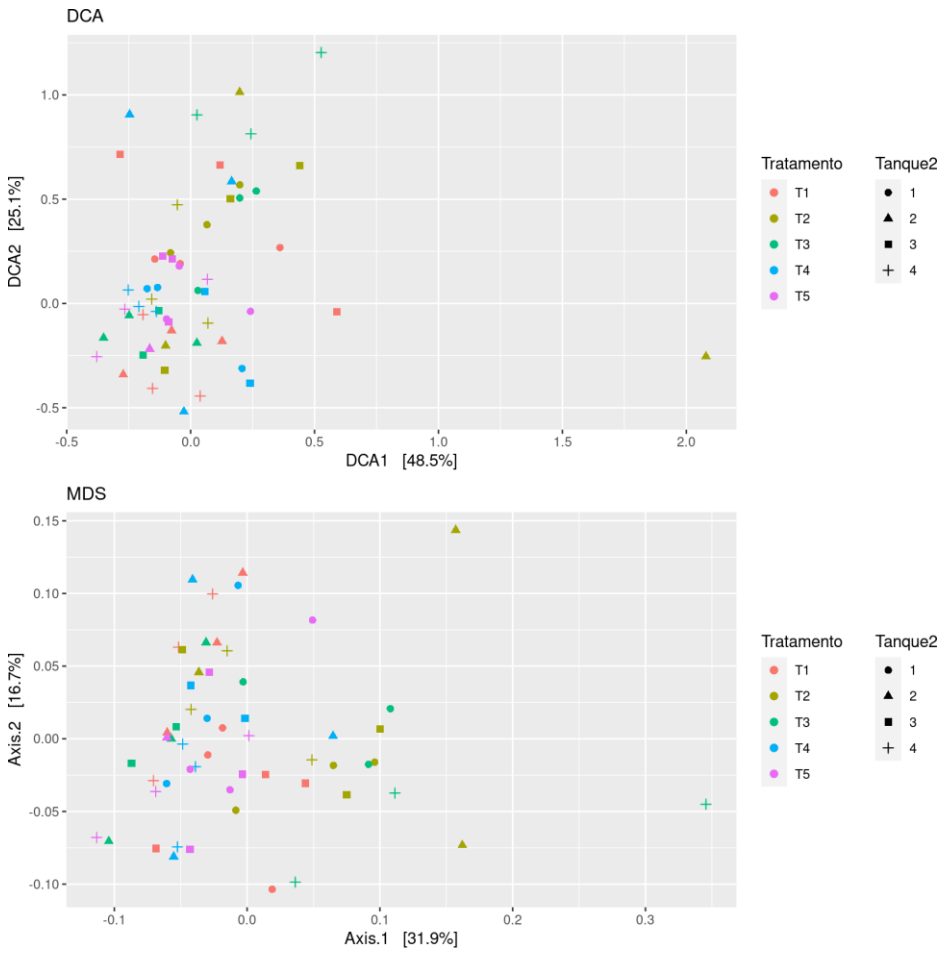
| Variáveis | Tratamentos (%) | | | | | CV | *p - valo* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| PI (g) | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | - | - |
| BI (g) | 2,380 | 2,380 | 2,380 | 2,380 | 2,380 | - | - |
| PF (g) | 3,62±0,24 | 3,75±0,11 | 3,51±0,03 | 3,36±0,08 | 3,87±0,11 | 8,33 | 0,1209 |
| BF (g) | 328,36±24,62 | 370,55±26,58 | 359,16±11,51 | 316,42±16,04 | 389,85±13,24 | 12,53 | 0,3071 |
| GP (g) | 3,60±0,24 | 3,73±0,11 | 3,49±0,03 | 3,34±0,08 | 3,85±0,11 | 8,38 | 0,1209 |
| GB (g) | 325,98±24,62 | 368,17±26,58 | 356,78±11,51 | 314,04±16,04 | 387,47±13,24 | 12,61 | 0,3071 |
| TCE (%) | 14,86±0,19 | 14,86±0,08 | 14,79±0,02 | 14,66±0,06 | 15,06±0,08 | 1,61 | 0,1260 |
| CA (g/) | 1,31±0,08 | 1,18±0,06 | 1,25±0,05 | 1,37±0,07 | 1,12±0,03 | 11,96 | 0,2801 |
| FC | 2,87±0,44 | 2,29±0,11 | 2,83±0,41 | 2,68±0,23 | 2,17±0,06 | 22,29 | 0,1755 |
| SO (%) | 97,50±0,34 | 98,13±0,39 | 97,50±0,34 | 97,71±0,39 | 97,50±0,34 | 0,71 | 0,5451 |

Os valores foram expressos em médias ± o erro padrão de quatros réplicas por tratamento; CV = coeficiente de variação (%); não significativo (P>0,05); Peso inicial (PI); Biomassa inicial (BI); Peso final (PF); Biomassa final (BF); Ganho empeso (GP); Ganho embiomassa (GB); Taxa de crescimento específico (TCE); Conversão alimentar (CA); Fator condição (FC); Sobrevivência (SO).

## 5.2. MICROBIOMA INTESTINAL

Para avaliação da diversidade beta, foram gerados gráficos da análise de correspondência destendenciada (DCA, do inglês *detrended correspondence analysis*) e do escalonamento multidimensional (MDS, do inglês *multidimensional scaling*) mostrando a métrica de distância UniFrac ponderada. Essa métrica é usada para comparar comunidades biológicas, e difere de outras medidas de dissimilaridade, como a dissimilaridade de Bray-Curtis, uma vez que incorpora informações de distâncias filogenéticas entre os microrganismos observados, através dessa foi possível observar que não houve diferença significativas (P>0,05) entre os tratamentos (1. controle, 2. 0,25% de carvacrol, 3. 0,25% de ácido cinamaldeído, 4. 0,25% de timol e 5. 0,25% do *blend*) para o índice avaliado (Figura14).

**Figura 14** - Diversidade beta do microbioma de alevinos de tilápias *(O. niloticus)*.



A alfa diversidade de cada amostra foi avaliada por meio dos índices de Shannon, Simpson (Figura 15), Chao (Figura 16) e Pielou (Figura 17) não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (1. controle, 2. 0,25% de carvacrol, 3. 0,25% de ácido cinamaldeído, 4. 0,25% de timol e 5. 0,25% do *blend*), para esses índices (P>0,05).

**Figura 15** - Alfa diversidade da microbiota intestinal de alevinos de tilápias

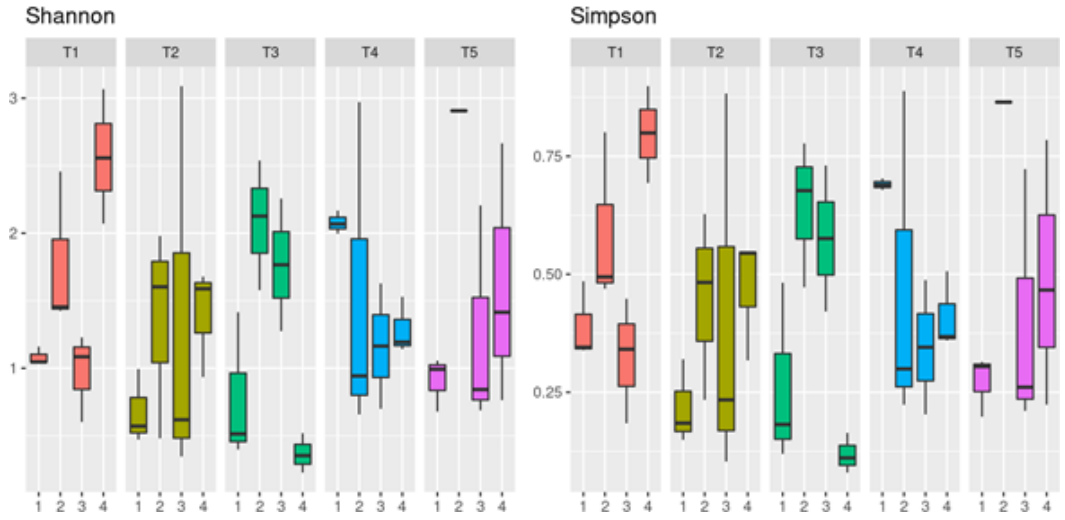



**Figura 16** - Diversidade alfa, representado pelo índice de riqueza Chao da microbiota de alevinos de tilápia (*O. niloticus*).

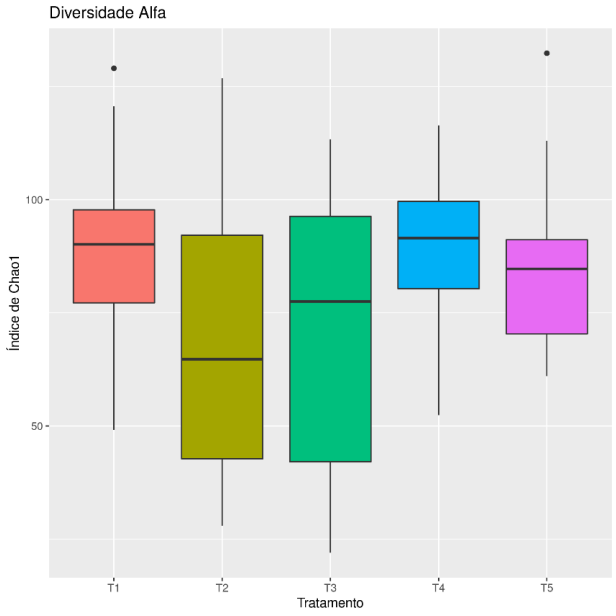
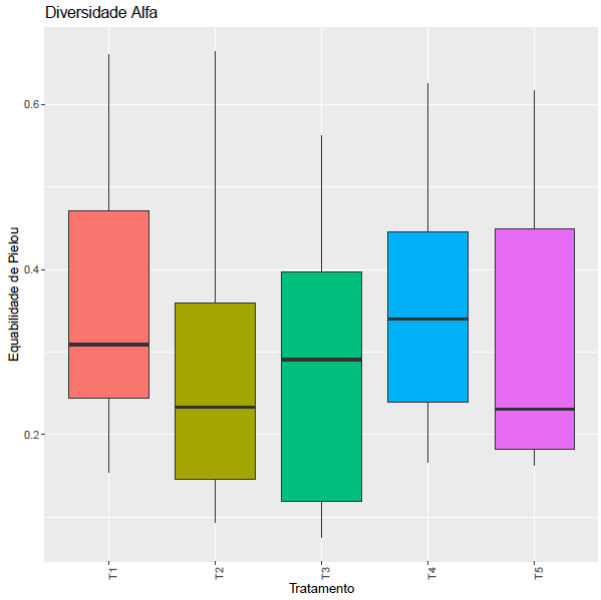


**Figura 17** – Diversidade alfa, representado pelo índice de Equitabilidade de Pielou da microbiota de alevinos de tilápia (*O. niloticus*).




Em relação à abundância relativa das distintas OTUS bacterianas na microbiota intestinal dos alevinos de tilápia em todos os tratamentos, foi observado a nível de filo que os mais abundantes foram *Fusobacteriota*, *Protobacteria* e *Actinobacteriota* (Figura 18). A nível de classe, foi averiguada a maior predominância de *Fusobacteria*, seguido de *Actinobacteria* e *Cyanobacteria* (Figura 19). Para o nível de ordem, a microbiota intestinal dos peixes foi dominada pela comunidade bacteriana representada por *Fusobacteriales, Corynebacteriales* e *Synechoccales* (Figura 20). Enquanto as famílias mais abundantes foram *Fusobacteriaceae*, seguido de *Mycobactariaceae* e *Cyanobacteriaceae* (Figura 21). *Cetobacterium, Mycobacterium* e *Plesiomonas* foram os gêneros mais abundantes, respectivamente (Figura 22).

**Figura 18** – Abundância relativa das distintas OTUS da microbiota intestinal de alevinos de tilápia a nível de filo.

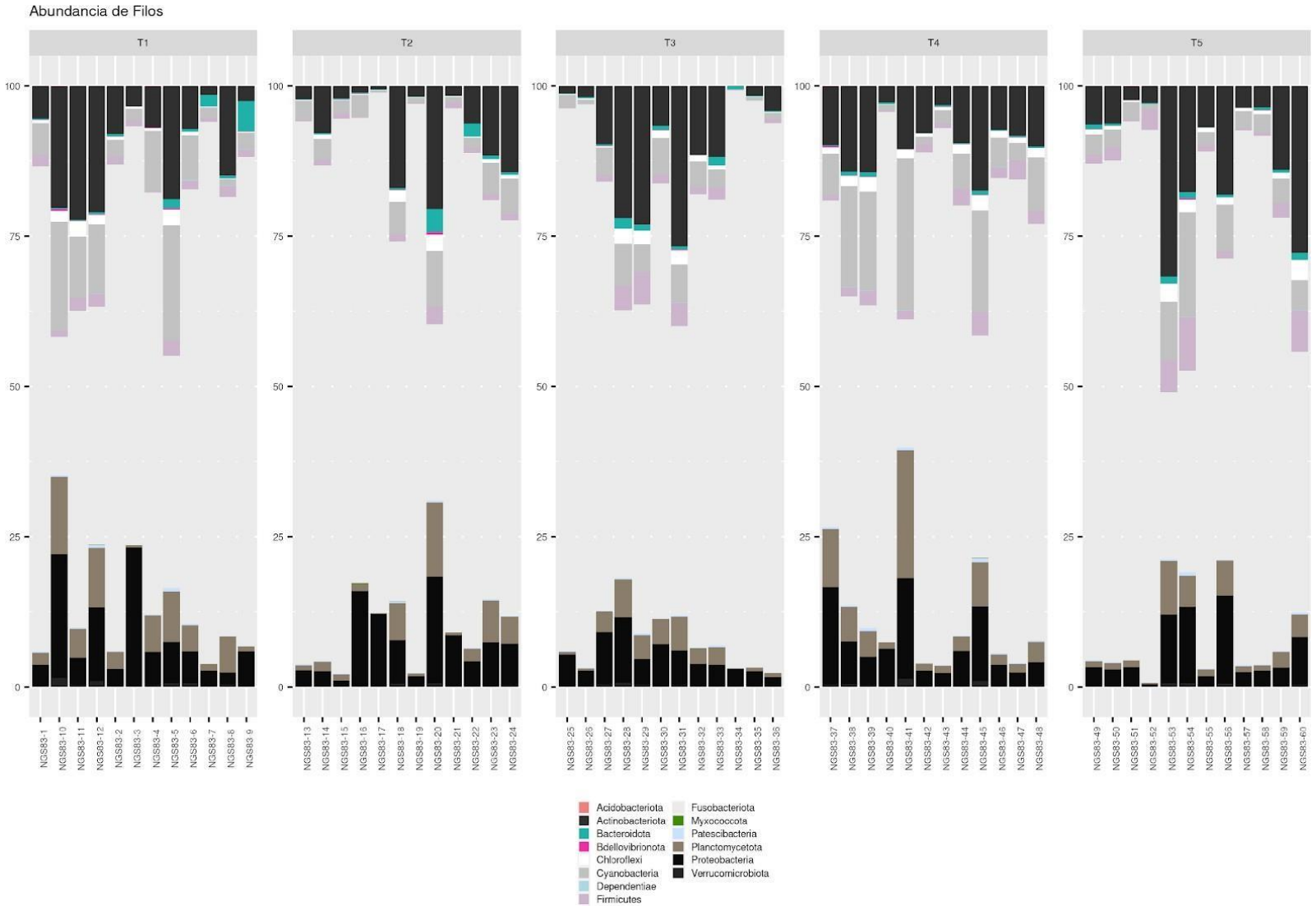


**Figura 19** - Abundância relativa das distintas OTUS da microbiota intestinal de alevinos de tilápia a nível de classe.

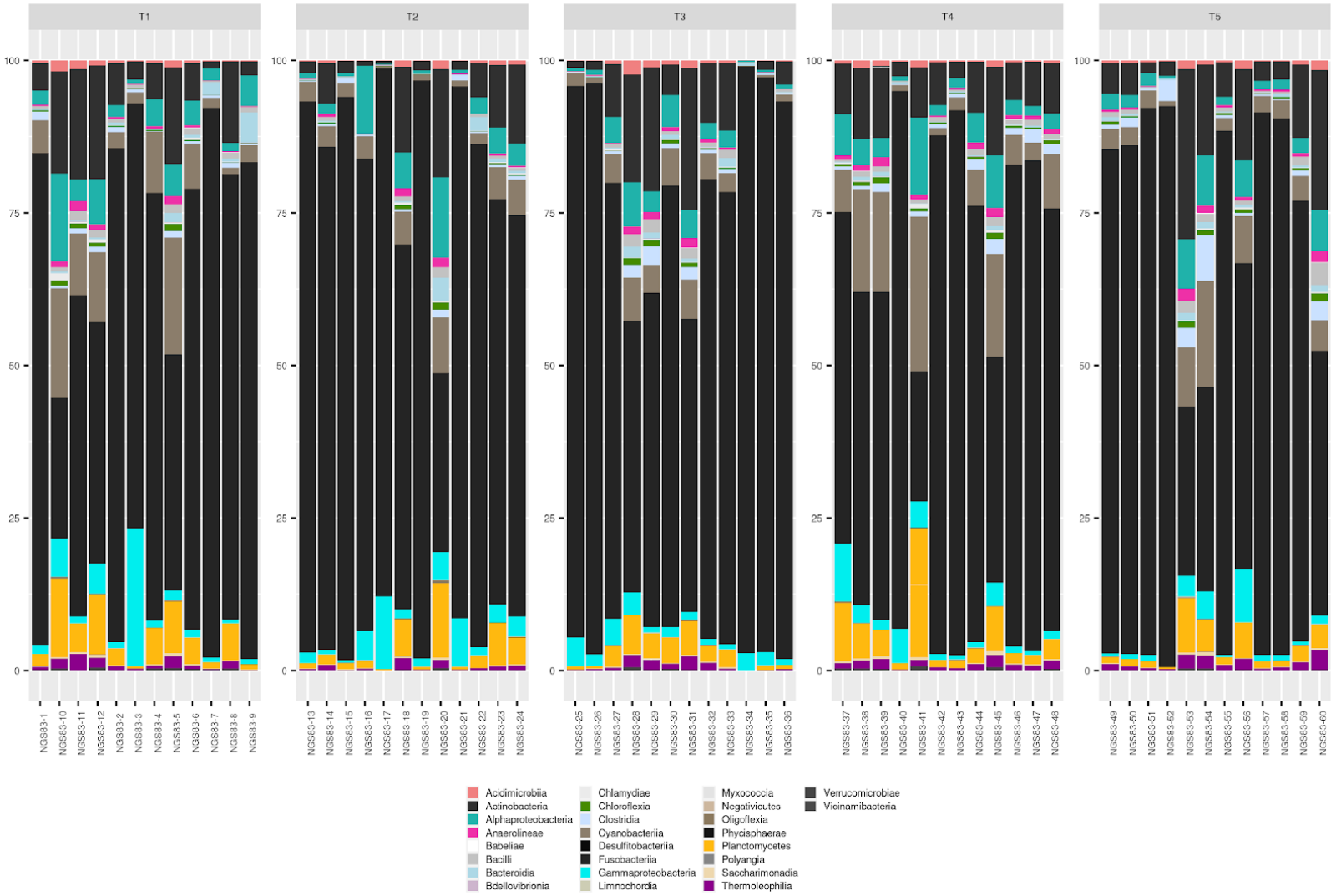


**Figura 20** - Abundância relativa das distintas OTUS da microbiota intestinal de alevinos de tilápia a nível de ordem.

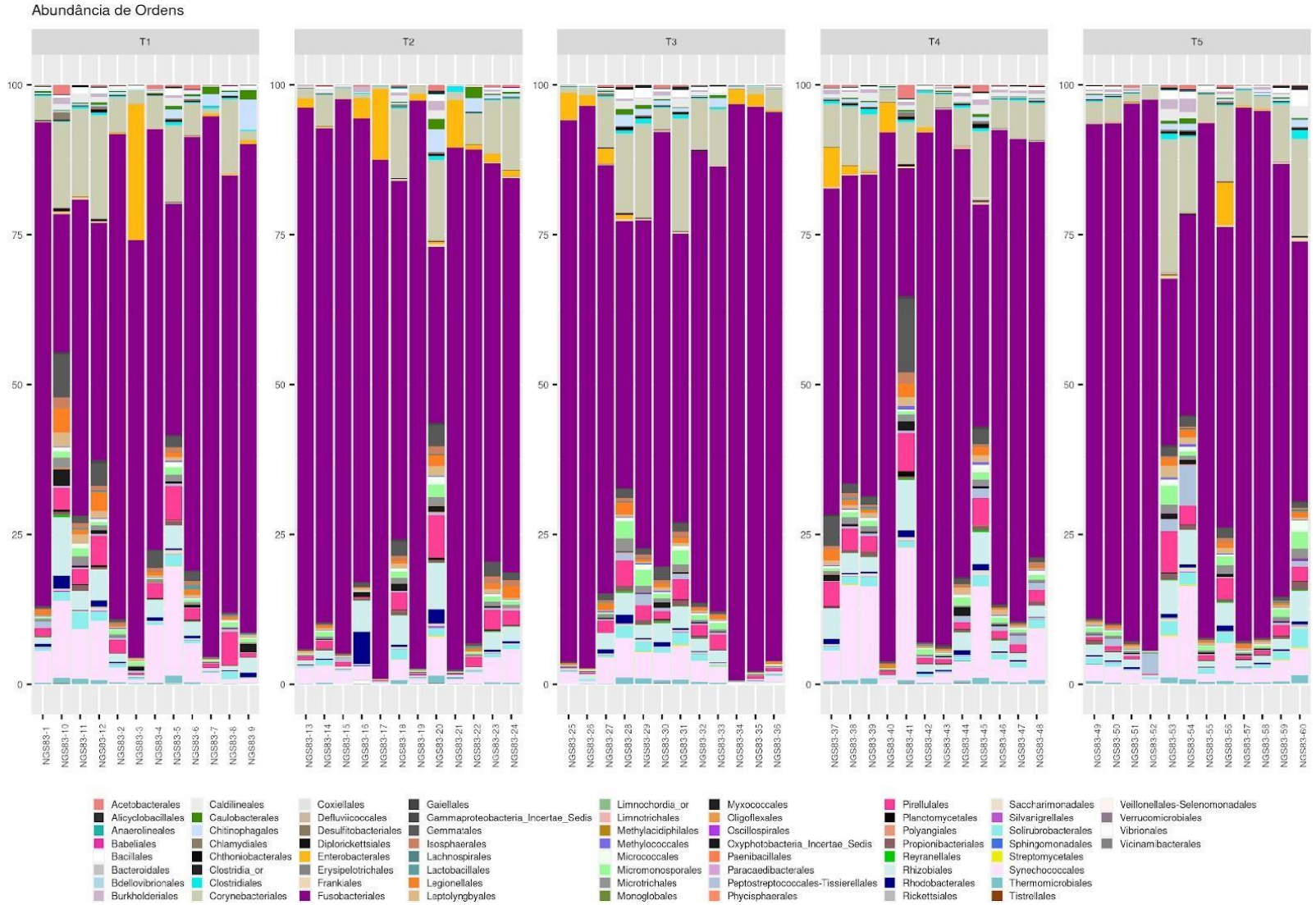


**Figura 21** – Abundância relativa das distintas OTUS da microbiota intestinal de alevinos de tilápia a nível de família.

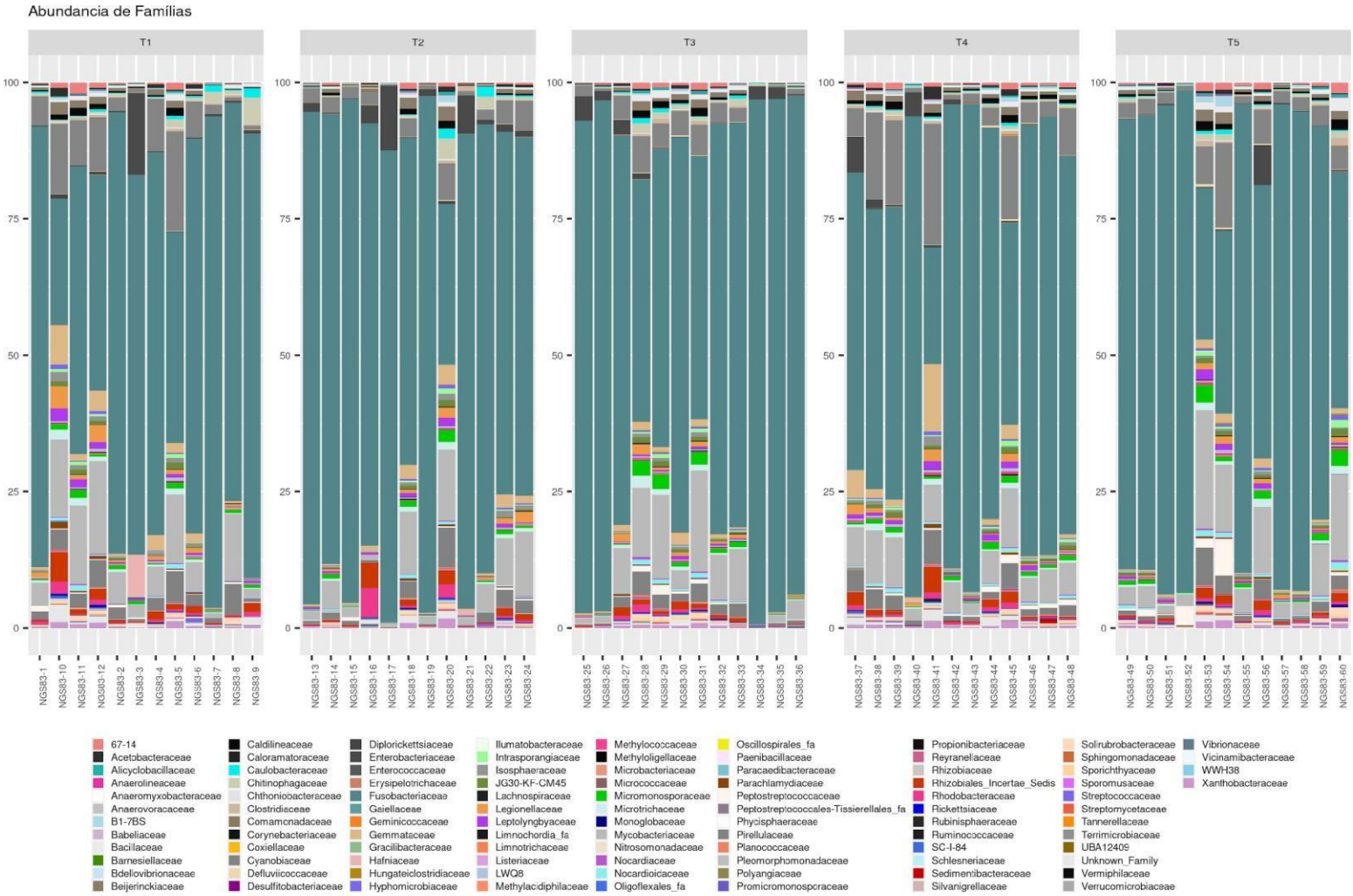
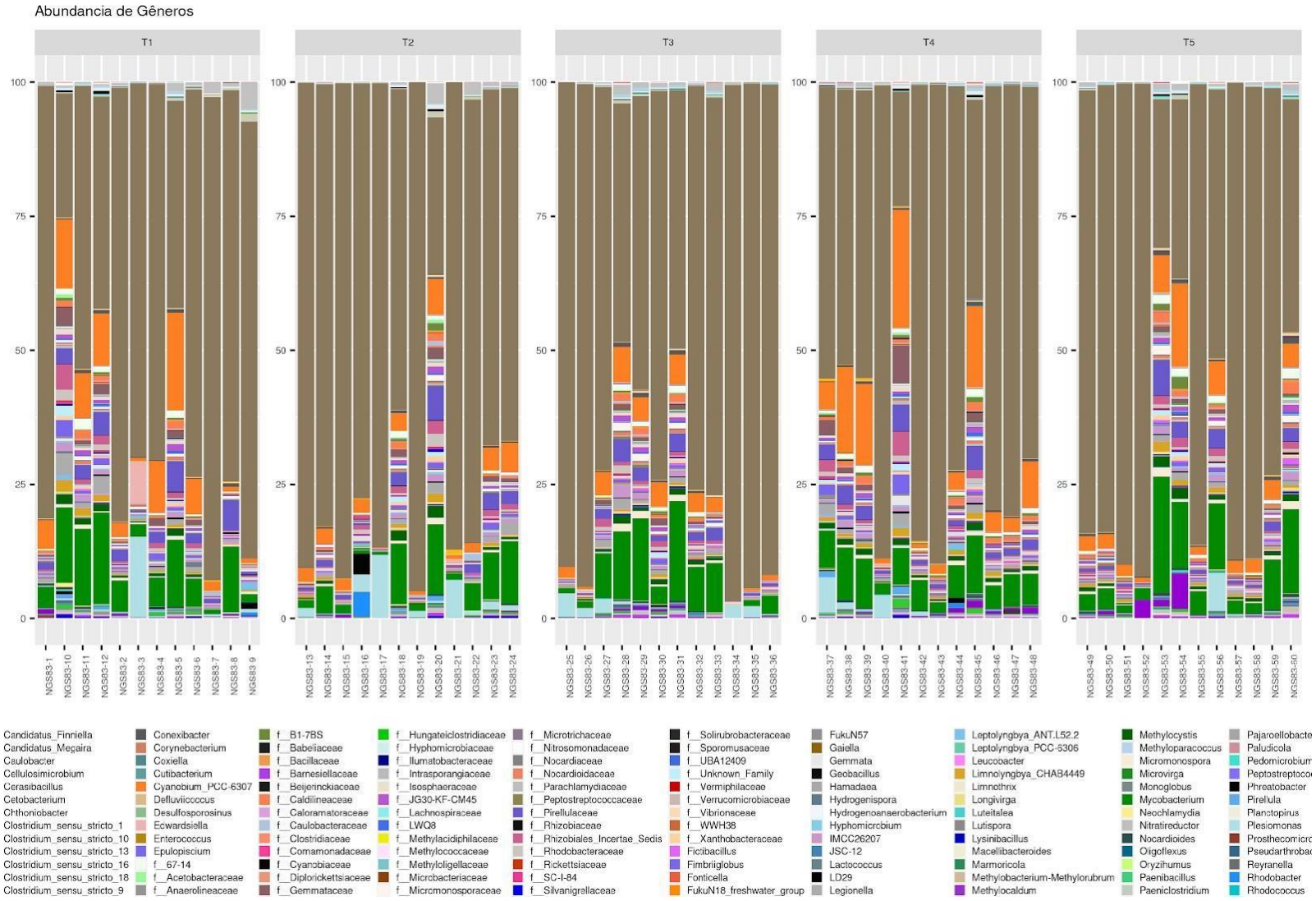


**Figura 22** – Abundância relativa das distintas OTUS da microbiota intestinal de alevinos de tilápia a nível de gênero.



# 6. DISCUSSÃO

## 6.1. DESEMPENHO PRODUTIVO

Os óleos essenciais estão sendo amplamente estudados como uma alternativa benéfica para os animais de produção, tanto para monogástricos, quanto para animais ruminantes. Na aquicultura, os óleos essenciais são considerados aditivos promissores para o crescimento e aumento da resistência a patógenos (Sousa *et al*., 2020; Chong *et al*., 2021; Montero *et al.*, 2022). Embora as pesquisas com óleos essenciais, ainda sejam consideradas escassas na dieta dos peixes e muitas vezes os resultados fornecidos pela literatura, sejam um tanto conflitantes, seu potencial como suplemento alimentar é de grande relevância.

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas para o desempenho produtivo. Tanto os óleos testados isoladamente quanto o composto de óleos essenciais não influenciaram no crescimento dos animais. Corroborando com a presente pesquisa, Cararo *et al.* (2017) não observaram efeito do óleo essencial de orégano com suplementação nas proporções 0.0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g de orégano $kg^{-1}$ na dieta, no desempenho produtivo de juvenis de jundiá (*Rhamdia sp*). Os autores também não observaram aumento na resistência dos animais, submetidos a um desafio com o protozoário ictio (*Ichthyophthirius multifiliis*).

Similarmente, Kanashiro (2015), não obteve efeito significativo do óleo de orégano com inclusão de 0,5 g $kg^{-1}$ no desempenho de juvenis de lambari do rabo amarelo (*Astyanax lacustris*). Sutili *et al.* (2016), testando o óleo essencial *Ocimum americanum* nas concentrações 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; e 2,0 g $kg^{-1}$ na dieta, não observaram diferenças significativas no desempenho zootécnico de *Sciaenops ocellatus*. Assim como, não foi observado efeito em tilápias-do-Nilo (*O. niloticus*) alimentadas com dietas suplementadas com óleos essenciais (Freccia *et al*., 2014; Campagnolo *et al.*, 2013).

Esses resultados sugerem que a eficácia dos óleos essenciais no desempenho de peixes pode variar significativamente dependendo da espécie estudada e das condições experimentais específicas. A complexidade das interações entre os compostos bioativos presentes nos óleos essenciais e a fisiologia dos diferentes organismos aquáticos pode explicar essa variabilidade nos resultados observados. É possível que as concentrações utilizadas nesses estudos não tenham sido suficientes para produzir efeitos significativos no desempenho dos peixes. Além disso, fatores como a qualidade e composição dos óleos

essenciais, o método de administração, a duração do tratamento e as condições ambienta is podem influenciar a eficácia desses produtos naturais. A ausência de efeitos positivos significativos no desempenho dos peixes não exclui necessariamente outros benefícios potenciais, como melhorias na saúde intestinal, resposta imunológica ou resistência a doenças, que não foram avaliados nesse estudo.

Algumas pesquisas têm mostrado os efeitos positivos dos óleos essenciais no desempenho produtivo dos peixes. Um exemplo é o estudo conduzido por Zaminha n-Hassemer *et al.* (2022), que avaliou o uso conjunto de carvacrol, timol e cinamaldeído em juvenis de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio de suplementação com níveis crescentes de óleos essenciais (controle, 3,3, 6,7 e 10 g/kg de dieta). Os resultados indicara m uma melhoria no desempenho de crescimento nos tratamentos com 3,3 g/kg, quando comparados ao grupo controle. O estudo realizado por Amer; Metwally; Ahmed (2018), com cinamaldeído e timol mostrou que a suplementação dietética com 1 ml de timol/kg de ração aumentou significativamente o desempenho de crescimento em comparação com outros grupos. Ambos os OEs reduziram a formação de malondialdeído (MDA), um biomarcador que indica o estresse oxidativo associado à inflamação, e aumentaram a atividade da glutatio na redutase no músculo, um importante antioxidante endógeno. Além disso, promoveram melhorias nos parâmetros imunológicos, incluindo um aumento na atividade da lisozima, elevação dos níveis de IgM e IgG, e maior atividade da catalase no soro. Entre os dois compostos, o timol demonstrou maior eficácia em estimular o crescimento e fortalecer as respostas imunológicas em comparação ao cinamaldeído.

Além disso, outras pesquisas obtiveram sucesso no uso de óleos essenciais como imunoestimulantes, antibacterianos, antivirais e antioxidantes (Ning *et al*., 2020; Dawood; Gewaily; Sewilam, 2022a; Roldán-Juárez *et al*., 2023). Estudos que utilizaram os óleos essenciais em conjunto obtiveram melhores resultados, como foi demonstrado por Firmino *et al.* (2021) que avaliaram o blend de timol e carvacrol e óleo essencial de alho na alimentação de juvenis de dourada *(Sparus aurata*) e observaram maior peso final, melhor conversão alimentar, melhor taxa de crescimento específico e ganho em peso em relação aos peixes alimentados com a dieta controle.

O *blend* de timol e carvacrol também foi testada na dieta de camarão-branco do Pacífico. Os animais que consumiram a dieta contendo 0,2; 0,4 e 0,6% do *blend* dos óleos essenciais, apresentaram melhora significativa no peso corporal final, ganho percentual de

peso e no coeficiente de crescimento térmico (CCT), sendo esse, um parâmetro utilizado na aquicultura para avaliar a eficiência de crescimento de peixes em relação à temperatura da água, ao tempo e conversão alimentar (Novriadi; Herman; Steven, 2023). Demonstrando que o *blend* dos óleos testados pode melhorar o desempenho produtivo dos animais.

El-Hawarry; Mohamed; Safinaz (2018), em estudo conduzido com juvenis de tilápias do Nilo, cultivadas em densidades diferentes e alimentadas com dietas contendo duas concentrações de óleo essencial de orégano (1,0 e 2,0 ml kg-¹), verificaram melhoria no desempenho dos animais nas densidades mais baixas e intermediárias que utilizaram óleos essenciais, nas densidades mais altas, a partir de análises de cortisol, superóxido dismutase, glutationa redutase e óxido nítrico, foi possível observar uma redução do estresse nos grupos alimentados com o óleo essencial. Esta resposta pode estar relacionada sobre o efeito dos óleos na estimulação das enzimas antioxidantes, reforçado pelos resultados obtidos por Giannenas *et al.* (2012) em sua revisão, e por Diler *et al.* (2017) no estudo com truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com suplementação de 0,125 mL $kg^{-1}$ de óleo essencial de orégano (*Origanum onites*) por 90 dias.

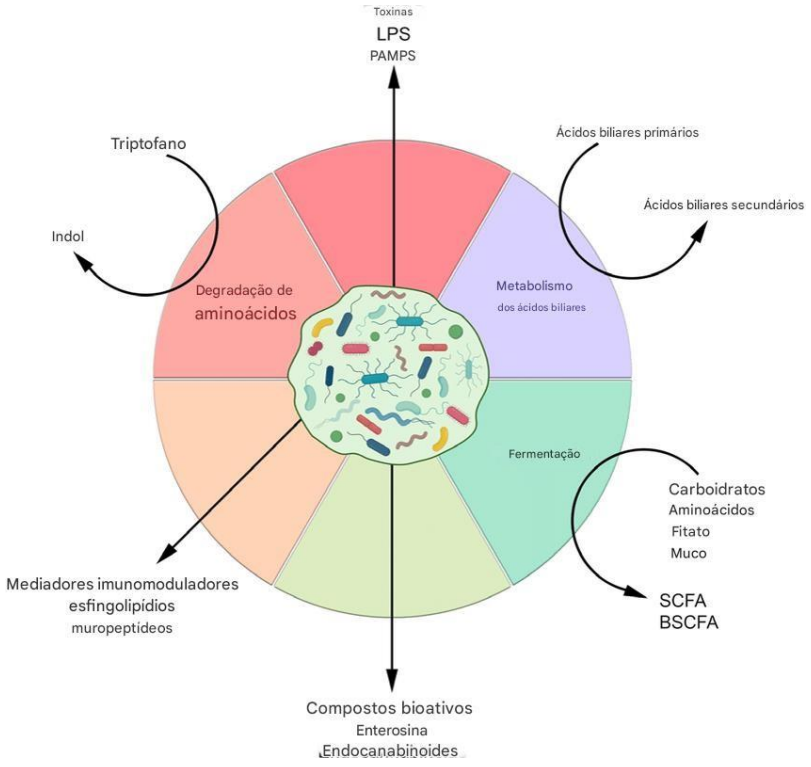
O fato do desempenho produtivo não ter sido influenciado pelas dietas suplementadas com óleos essenciais no presente estudo pode estar associado a diversos fatores. As doses empregadas podem não ter sido suficientes para promover um efeito positivo no desempenho zootécnico dos animais. A quantidade de suplementação utilizada pode ter sido inadequada para desencadear as respostas fisiológicas esperadas. Além disso, o tempo de administração da dieta suplementada também deve ser considerado, é possível que a duração do experimento não tenha sido suficiente para que os efeitos positivos dos óleos essenciais no metabolismo dos animais se manifestassem no organismo dos peixes. O metabolismo e a adaptação dos peixes às novas dietas podem requerer um período mais prolongado para que os benefícios sejam observados de forma significativa.

Outro fator relevante é a fase de desenvolvimento dos peixes durante o experime nto, é importante ressaltar que as espécies podem responder de maneira distinta às dietas em diferentes estágios de crescimento. Peixes em fases iniciais de desenvolvimento podem apresentar necessidades nutricionais e respostas fisiológicas diferentes daqueles em estágios mais avançados, o que pode influenciar a eficácia da suplementação com óleos essenciais.

## 6.2. MICROBIOMA INTESTINAL

O microbioma intestinal modula o metabolismo e a imunidade do hospedeiro por meio da produção de metabólitos e moléculas bioativas (Thursby; Juge, 2016). Bactérias intestinais convertem ácidos biliares primários em secundários e fermentam carboidratos, aminoácidos, fitatos e mucinas, gerando ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), como butirato, propionato e acetato, essenciais para energia e expressão gênica (Thursby; Juge, 2016; Voz *et al*., 2022). Além disso, produzem enterosinas, endocanabinoides, esfingolipídios e muropeptídeos, que regulam a imunidade, a degradação de aminoácidos forma triptofano e indóis, precursores da serotonina, influenciando o bem-estar (Voz *et al*., 2022). Em disbiose, o microbioma pode liberar toxinas, como lipopolissacarídeos (LPS), induzindo inflamação, enquanto em simbiose, os LPS auxiliam na defesa contra patógenos, o microbioma também participa da formação de PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Micróbios), como LPS, peptidoglicanos e flagelina, que ativam a resposta imune inata (Figura 23) (Voz *et al*., 2022).

**Figura 23 -** Moléculas e metabólitos produzidos pela microbiota intestinal




Fonte: Vos *et al*., 2022.

A microbiota intestinal dos peixes começa a ser estabelecida na fase de desenvolvimento do saco vitelínico, juntamente com o início da ingestão de bactérias oriundas da água em que os animais estão sendo cultivados (Hanses & Olafsen, 1999). A dominância de quatro filos predominantes, como *Proteobacteria, Fusobacterium, Actinobacteria* e *Cyanobacteria* (Vorste; Sarremejane; Datry, 2020). A comunidad e microbiana intestinal dos peixes interage em vários níveis com o sistema imunológico e fornece sinais que promovem a produção de citocinas, levando a maturação das células imunes, modulando o desenvolvimento normal das funções imunológicas do sistema imune do hospedeiro, mantendo um relacionamento mutuamente benéfico entre a microbiot a intestinal e organismo. Um ecossistema altamente complexo que interage com o hospedeiro, compõem a microbiota, agindo diretamente sobre a digestão e absorção dos nutrientes, modulando o estado nutricional e metabólico do animal, além de exercer papel fundamental no sistema imunológico (Nicholson *et al*., 2012; Carrera–Quintanar *et al.,* 2018; Hoseinifar *et al*., 2019; Hoseinifar *et al*., 2024).

Contudo, alguns fatores podem modificar a estrutura da microbiota intestinal, como o estágio de desenvolvimento, espécie, dieta, diversidade de hábitos alimentares e fatores ambientais como, temperatura, qualidade da água, densidade de estocagem e estressores ambientais (Ley *et al*., 2006; Navarrete *et al*., 2009; Ward; Classen; Buchanan, 2009; Adamovsky *et al*., 2018; Hoseinifar *et al.*,2024). Os óleos essenciais são considerados alternativas promissoras na aquicultura, pois podem atuar como prebióticos na microbiota, promovendo a modulação da composição bacteriana (Gupta; Khan; Khan, 2021; Bandeira-Junior *et al*., 2022).

Nesse sentido, os mecanismos propostos para a ação dos prebióticos relacionados ao uso de óleos essenciais nas dietas para peixes envolvem alterações nas comunidades bacterianas, o que resulta no aumento de populações benéficas que favorecem a produção de compostos inibitórios, a competição por nutrientes ou energia disponíveis, a disputa por locais de adesão, a inibição da expressão de genes virulentos ou a interrupção do quorum sensing, que é um processo que permite que bactérias individuais em uma colônia coordenem e realizem funções coletivas, como esporulação, bioluminescência, virulência, conjugação, competência e formação de biofilmes (Sutili *et al*., 2018; Merrifield *et al*., 2010).

No presente estudo, os filos predominantes na microbiota das tilápias, incluem, *Fusobacteriotaa, Proteobacteria e Actinobacteriota,* condizendo com os estudos publicados

na literatura, em que relatam que as bactérias que colonizam o trato intestinal dos peixes, são constituídos por *Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia* e *Bacilos,* nem sempre nessa mesma ordem (Li *et al*., 2013; Carda-Diéguez *et al*., 2014; Ingerslev *et al*., 2014; Phrompanya; Saenphet; Saenphet, 2019; Huaiquipán *et al*., 2023).

Existe uma grande variação nos gêneros que habitam a microbiota intestinal dos peixes. Contudo, o gênero *Cetobacterium* que foi o mais abundante em todos os tratamentos do presente estudo, é comumente encontrado em predominância na microbiota intestinal dos peixes de água doce, como relatado por Eichmiller *et al*., (2016), em trabalhos com carpas, Bledsoe *et al*., (2016) em estudo com bagre do canal, Lyons *et al*., (2017) com truta-arco- íris e por Fan *et al*., (2017) e Zhang *et al*., (2016) em pesquisas com tilápias. O gênero *Cetobacterium* está relacionado com a produção de vitamina B-12 no intestino dos peixes. Em humanos, essa mesma vitamina desempenha funções na síntese de ácidos graxos, na imunomodulação de linfócitos T e citocinas (Zhang *et al*., 2022).

A microbiota intestinal dos peixes é considerada uma comunidade. Diferenças entre bactérias não são o suficiente para modular a microbiota dos animais. O índice de Shannon indica a diversidade da comunidade bacteriana, Chao mostra a riqueza de espécies na microbiota e Pielou indica se a comunidade está em equilíbrio. No presente estudo, os índices testados mostraram que não houve diferenças entre os tratamentos ao ponto de modular a microbiota intestinal dos peixes pela suplementação do composto de óleos essenciais.

Deng *et al*. (2023) analisaram o uso de *Cuminum cyminum* como aditivo na dieta de *Oreochromis niloticus*, administrando concentrações de 1% e 3% do fruto e do caule de maneira isolada, durante oito semanas. Nos grupos controle e com 1% do fruto, foi observada uma predominância de *Fusobacteriota*, seguida por *Bacteroidota* e *Proteobacteria*. No entanto, dietas suplementadas com 3% do fruto ou do caule resultaram em aumento significativo de *Proteobacteria* e redução expressiva de *Fusobacteriota* e *Bacteroidota*. Além disso, a suplementação reduziu a abundância de *Firmicutes*, *Patescibacteria* e *Acidobacteriota* em comparação ao controle. Ao nível de gênero, *Plesiomonas* e *Cetobacterium* foram mais abundantes nos tratamentos com 3% de suplementação, enquanto todos os tratamentos com cominho reduziram a presença de *Romboutsia* e *Pseudomonas*. A suplementação com 1% do caule promoveu um aumento significativo de *Actinobacteria*, tornando-o o filo dominante, com uma maior abundância do gênero *Mycobacterium*.

Análises também revelaram que vias do microbioma relacionadas a procariontes, transporte e catabolismo, motilidade celular, transdução de sinal, transporte de membrana, dobramento e degradação de proteínas, bem como doenças infecciosas, foram positivamente reguladas nos tratamentos com 3% de suplementação.

O estudo conduzido por Zong-Xian *et al*. (2023) avaliou o impacto da suplementação de óleo de Patchouli (PO) na tilápia GIFT, utilizando concentrações de 5 e 15 µL PO/g por 28 dias, visando testar a resistência dos organismos frente a infecções por *Streptococcus agalactiae*. A análise revelou variações significativas na composição microbiana entre os grupos infectados e não infectados pela bactéria patogênica. Os grupos não infectados apresentaram uma estrutura microbiana semelhante à dos grupos suplementados com PO. A suplementação na concentração de 15 µL PO/g influenciou a abundância relativa de bactérias benéficas e patogênicas. Foi observada uma redução significativa de *Streptococcus*, acompanhada por um aumento de *Cetobacterium* e *Clostridium_sensu_stricto_1*, microrganismos conhecidos por seus efeitos probióticos. Além disso, os grupos suplementados com PO apresentaram aumento das vilosidades intestinais e melhoria das barreiras físicas do intestino, reduzindo a invasão de *S. agalactiae* em tilápias. Houve ainda, um enriquecimento nas vias metabólicas relacionadas ao sistema imunológico, incluindo o lúmen lisossomal, o complexo de proteína MHC (Moléculas Clássicas de Histocompatibilidade) e a via de sinalização do receptor toll-like 2, indicando que a suplementação com PO não apenas influencia a composição microbiana, mas também fortalece as respostas imunológicas e a integridade intestinal dos peixes.

Outros estudos demonstram os efeitos benéficos dos óleos essenciais na microbiota intestinal de peixes. Bandeira-Júnior *et al*. (2022) observaram que o cinamaldeído, quando administrado a uma concentração inferior a 500 µg/mL nas dietas, reduziu a presença de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Dawood *et al*. (2022b) mostraram que o óleo essencial de *Origanum vulgare*, suplementado a 1g/kg durante oito semanas, teve um efeito modulador na microbiota de tilápias, melhorando a resposta imunológica a patógenos, atenuando os impactos do estresse térmico, promovendo o desempenho de crescimento e regulando as características bioquímicas do sangue.

Cardoso *et al*. (2024), ao testar o óleo essencial de *Lippia sidoides* na concentração de 0,25%, observaram melhorias na microbiota e na integridade intestinal de *Danio rerio*. Os autores atribuem esses benefícios aos compostos químicos presentes em determinados

óleos essenciais, que podem promover efeitos positivos na saúde intestinal dos anima is, como a produção de muco no epitélio intestinal, além de estimular a proliferação de microrganismos benéficos e reduzir a abundância de patógenos. No entanto, as alterações na microbiota intestinal podem estar associadas, entre outros fatores, à duração da suplementação dietética. Da mesma forma, Zaminhan-Hassemer *et al*. (2022) avaliaram a utilização de um *blend* de óleos essenciais (carvacrol + timol + ácido cinamaldeído) para juvenis de tilápia do Nilo e observaram que os peixes alimentados com a dieta contendo 3,3 g/kg apresentaram maior abundância dos gêneros *Candidatus xiphinematobacter*, *Staphylococcus*, *Caldilinea* e *Synechococcus* na microbiota intestinal. Por outro lado, os peixes que receberam a dieta controle apresentaram maior presença das bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*.Yousefi *et al*. (2022) avaliando o óleo essencial *Thymus vulgaris* combinado com prebióticos (*Immu-nogen*) nas concentrações de 0,2% de imunogênio com 2% de timol por 60 dias, não observaram modificações na microbiota intestinal de truta-arco-íris (*O. mykiss*), no entanto, houve um aumento de atividade enzimática no intestino dos peixes, além de observarem melhorias no desempenho produtivo.

Os efeitos estimulantes dos óleos essenciais também são relatados, eles podem atuar melhorando a secreção de enzimas (Yousefi *et al*., 2022), permitindo uma modulação na microbiota, esse efeito, melhora a digestão e absorção dos nutrientes, proporcionando uma maior variedade de aminoácidos para síntese de proteínas e consequentemente, aumentando o teor de proteínas no organismo (Pu *et al*., 2020; Chen *et al*., 2021; Bandeira *et al*., 2022; Dawood; Gewaily; Sewilam, 2022(a); Gholami-Ahangari *et al*., 2022). Dessa forma, os efeitos dos óleos essenciais na microbiota intestinal, pode ser similar aos promotores de crescimento, onde os mecanismos de ação estão relacionados diretamente às atividades nas bactérias, melhorando a utilização dos nutrientes e logo, maximizando o desempenho produtivo (Zhang *et al*., 2022; Yousefi *et al*., 2022).

Além de atuarem como estimulantes, os óleos essenciais desempenham um importante papel no sistema imunológico dos peixes, atuando como imunoestimulantes além de suas propriedades estimulantes (Ahmadifar *et al*., 2021). Zhang *et al*. (2020) investigara m esse efeito ao suplementar a dieta de carpa-koi (*Cyprinus carpo*) com óleo essencial de orégano (Origanum vulgare) nas concentrações de 500, 1500 e 4500 mg/kg durante quatro semanas. Os resultados revelaram um aumento significativo nos níveis de hemólise mediada

pelo sistema complemento, indicando sua ativação. Este sistema representa a principal linha de defesa antimicrobiana da imunidade inata em peixes e contribui para a resposta imune adquirida. Parâmetros como a atividade hemolítica e os níveis de proteínas do compleme nto no soro foram utilizados para avaliar a ativação do sistema complemento. O comportamento desses parâmetros demonstrou um aumento dose-dependente, com os níveis mais elevados observados na concentração de 4500 mg/kg.

Corroborando esses achados, Valladão *et al.* (2017) também observaram a ativação do sistema complemento em tilápias (*O. niloticus*) suplementadas com *Mentha piperita* e *Malaleuca alternifolia* nas concentrações de 100 e 250 mg k-1 amostrados nos dia 7, 14, 30 e 60 dias, após a suplementação com os OEs. Adicionalmente, Brum *et al*. (2018) demonstraram a ação imunoestimulante dos óleos essenciais ao avaliar a suplementação de 1% de *Zingiber officinale* em tilápias (*O. niloticus*) por 35 dias. Neste estudo, observou-se um aumento nos níveis da enzima lisozima em resposta à suplementação do óleo essencial. A lisozima, uma enzima com função bacteriolítica, é encontrada no muco, tecidos linfo ide s, plasma e distribuída em diferentes órgãos, constituindo um dos principais mecanismos de defesa inespecífico dos peixes (Uribe *et al*., 2011).

Outro efeito relatado dos óleos essenciais, é sobre a morfologia intestinal dos anima is (Zeppenfeld *et al*., 2016). O intestino exerce funções cruciais no metabolismo, pois age na digestão e assimilação dos nutrientes. Um epitélio intestinal íntegro, é fundamental para prevenção de doenças infecciosas, pois atua como uma barreira intestinal, além de favorecer a proliferação de bactérias benéficas a microbiota, como as *Bifidobactérias* e *Lactobacillus*, que ajudam no crescimento e maturação das vilosidades intestinais refletindo no desempenho dos animais. O epitélio também atua evitando a passagem de compostos nocivos para dentro do lúmen intestinal, como antígenos e outras toxinas (Valladão *et al*., 2017; Hoseinifar *et al*., 2024).

Trabalhos conduzidos com peixes corroboram com a eficácia dos óleos essenciais no desenvolvimento do epitélio intestinal. Zeppenfeld *et al*. (2016) observaram aumento das dobras intestinais em Jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dieta contendo 2,0 ml $kg^{-1}$ do óleo essencial de *Aloysia triphylla*, resultando em melhoria do desempenho produtivo dos peixes. Esta melhoria está relacionada ao aprimoramento das características dos vilos e vilosidades da mucosa intestinal, que favoreceu de maneira geral os processos digestivos e absortivos. De maneira similar, Valladão *et al*. (2017), em suas análises com suplementação

de *Malaleuca alternifolia* por 60 dias em tilápias do Nilo (*O. niloticus*), verificaram um aumento no tamanho das vilosidades no grupo suplementado com a concentração de 250 mg kg-1 em relação aos outros grupos. Este aumento resulta em uma superfície intestinal maior, melhorando potencialmente a absorção e utilização dos nutrientes.

O desenvolvimento do epitélio intestinal não apenas promove melhor absorção de nutrientes, mas também desempenha funções importantes na imunidade e na barreira intestinal. O epitélio intestinal atua como uma barreira física e imunológica contra patógenos e toxinas, além de ser responsável pela secreção de muco e peptídeos antimicrobia nos (Groschwitz e Hogan, 2009). Ademais, o epitélio intestinal está envolvido na regulação da permeabilidade intestinal e na modulação da resposta imune local (Peterson e Artis, 2014). A melhoria na estrutura e função do epitélio intestinal contribui para a liberação de metabólitos e, consequentemente, melhora o aproveitamento dos alimentos, aumentando os parâmetros de desempenho produtivo desses animais (Mohamed *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2020, 2022). É importante ressaltar que o efeito dos óleos essenciais na morfologia intestina l não é observado em um curto período, sendo necessário, pelo menos, dois meses de suplementação para observar resultados significativos (Valladão *et al*., 2017).

Os óleos essenciais demonstram notável ação antimicrobiana, oferecendo benefícios significativos para a saúde e sobrevivência de diversas espécies de peixes. A suplementação com apenas 0,05% de compostos de óleos essenciais, como timol e carvacrol, reduziu a mortalidade do bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) quando, após oito semanas de alimentação, foram expostos à *Aeromonas hydrophila* (Zheng *et al*., 2009). O timol, em particular, na concentração de 20mg/kg de ração, durante 5 semanas, exibiu uma atividade antibacteriana contra patógenos comumente encontrados em trutas-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e salmonídeos saudáveis (Navarrete *et al*., 2010). Em estudo com tilápias (*O. mossambicus*) desafiadas com *Edwardsiella tarda*, Baba *et al.* (2016) observaram que os animais alimentados com dietas suplementadas com óleo essencial de *Citrus sinensis* nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1% por 60 dias, apresentaram mortalidade reduzida em relação ao grupo controle, alimentados apenas com ração comercial.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, observada nos estudos mencionados, é geralmente atribuída à presença de grupos hidroxila em compostos fenólicos. Esses compostos interagem com proteínas por meio de pontes de hidrogênio, além de promoverem interações iônicas e hidrofóbicas. Eles também podem reduzir a concentração interna de ATP

sem que haja um aumento correspondente na concentração externa, o que resulta em uma diminuição na síntese ou em uma maior hidrólise de ATP. Esse efeito altera a permeabilidade da membrana e compromete sua integridade, levando à morte do microrganismo (Sutili *et al*., 2017; Ultee; Bennik; Moezelaar, 2002).

No presente estudo, não foi observada diferença significativa na composição da microbiota intestinal dos alevinos, o que pode ser explicado pela ausência de desafios ambientais durante o período experimental (Campagnolo *et al*., 2013). As condições ambientais favoráveis em que os peixes foram mantidos pode ter dificultado a queda na qualidade da água e a presença de patógenos, fatores que normalmente estimulariam uma modulação da microbiota intestinal. Em cenários de desafios ambientais, como variações na qualidade da água ou exposição a patógenos, espera-se que os alevinos apresentem uma modulação mais evidente em seu microbioma (Lobionda *et al*., 2019). Esse aspecto sugere que a resposta do microbioma intestinal à suplementação com óleos essenciais pode ser mais pronunciada quando os organismos enfrentam condições estressantes que comprometem a integridade da microbiota e favorecem a proliferação de patógenos.

## 7. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais isolados, assim como o *blend* de orégano, timol e ácido cinamaldeído testados nas condições experimentais deste estudo, não apresentaram impacto no desempenho produtivo nem causaram alterações na microbiota intestinal dos alevinos de tilápia. Recomenda-se a realização de novos estudos com a mesma espécie, utiliza ndo períodos mais longos e maiores concentrações de óleos essenciais na dieta.

## REFERÊNCIAS


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

ABDEL RAHMAN, A. N.; ELHADY, M.; SHALABY, S. I. Efficacy of the dehydrated lemon peels on the immunity, enzymatic antioxidant capacity and growth of Nile tilapia *(Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v. 505, p. 92-97, 2019.

ABREU, B. B.; PASSOS, J. C.; SOUSA, C. R. N.; BRANDÃO, A. C. A. S.; MARINHO, A. R. S.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. D. R. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante em cálice de hibisco (*Hibiscus sabdariffa L.*). **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 4, n. 1, p. 1, 2020.

ACAR, Ü.; KESBİÇ, O. S.; YILMAZ, S.; INANAN, B. E.; ZEMHERI-NAVRUZ, F.; TERZI, F.; FAZIO, F.; PARRINO, V. 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, p. 1431, 2021.

ADAMOVSKY, O.; BUERGER, A. N.; WORMINGTON, A. M.; ECTOR, N.; GRIFFITT, R. J.; BISESI, J. H.; MARTYNIUK, C. J. The gut microbiome and aquatic toxicology: An emerging concept for environmental health. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, p. 2758-2775, 2018.

AHMADIFAR, E.; POURMOHAMMADI FALLAH, H.; YOUSEFI, M.; DAWOOD, M. A. O.; HOSEINIFAR, S. H.; ADINEH, H.; YILMAZ, S.; PAOLUCCI, M.; DOAN, H. V. The Gene Regulatory Roles of Herbal Extracts on the Growth, Immune System, and Reproduction of Fish. **Animals (Basel)**, v. 11, n. 8, p. 2167, 2021.

AL-SAGHEER, A.; MAHMOUD, H.; REDA, F.; MAHGOUB, S.; AYYAT, M. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, p. 1006–1014, 2018.

ALEXANDRE, J.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; BUZOLLO, H.; SENHORINI, J.; CHAGURI, M. Structural analysis of the embryonic development in *Brycon cephalus* (Gnther, 1869). **Zygote**, v. 18, p. 173-183, 2009.

ALMEIDA, A. P. S.; PINTO, M. F.; POLONI, L. B.; PONSANO, E.; GARCIA NETO, M. Effect of linseed oil and vitamin E consumption on poultry performance and carcass traits. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 698-705, 2009.

AMER, S. A.; METWALLY, A. E.; AHMED, S. A. A. The influence of dietary supplementation of cinnamaldehyde and thymol on the growth performance, immunity and

antioxidant status of monosex Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). **Egypt. J. Aquat. Res**, v. 44, p. 251–256, 2018.

ANDROUTSOPOULOU, C.; KOTSALOU, C.; HAHALIS, P.; CHRISTOPOULOU, S. D.; VANTARAKIS, A.; LAMARI, F.N. Essential Oils and Extracts of Rose Geranium and Rose Petals as Natural Preservatives in Terms of Toxicity, Antimicrobial, and Antiviral Activity. **Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 494, 2021.

BANDEIRA JUNIOR, G.; BIANCHINI, A. E.; SOUZA, C. F; DESCOVI, S. N.; FERNANDES, L. S.; SILVA, L. L.; CARGNELUTTI, J. F.; BALDISSEROTTO, B. The Use of Cinnamon Essential Oils in Aquaculture: Antibacterial, Anesthetic, Growth-Promoting, and Antioxidant Effects. **Fishes**, v. 7, p. 133, 2022.

BASMACIOĞLU, H. M.; BAYSAL, S.; MISIRLIOĞLU, Z.; POLAT, M.; YILMAZ, H.; TURAN, N. Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets. **Br Poult Sci.**, v. 51, n. 1, p. 67-80, 2010.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

BENTO, M. H. L.; OUWEHAND, A.; TIIHONEN, K.; LAHTINEN, S.; NURMINEN, P.; SAARINEN, M.; SCHULZE, H.; MYGIND, T.; FISCHER, J. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals-effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, p. 449-458, 2013.

BLEDSOE, J. W.; PETERSON, B. C.; SWANSON, K. S.; SMALL, B. C. Ontogenetic Characterization of the Intestinal Microbiota of Channel Catfish through 16S rRNA Gene Sequencing Reveals Insights on Temporal Shifts and the Influence of Environmental Microbes. **PLoS One.**, v. 11, n. 11, p. e0166379, 2016.

BOTSOGLOU, N. A.; FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E.; FLETOURIS, D. J.; SPAIS, A. B. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. **Br Poult Sci.**, v. 43, n. 2, p. 223-30, 2002.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **Int J Food Microbiol.**, v. 94, n. 3, p. 223-53, 2004.

BRUM, A.; CARDOSO, L.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; MOURIÑO, J. L. P.; MARTINS, M. L. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*, **Aquaculture**, v. 490, p. 98-107, 2018.

ÇABUK, M.; BOZKURT, M.; ALÇIÇEK, A.; AKBAS, Y.; KÜÇÜKYILMAZ, K. Effect of a herbal essential oil mixture on growth and internal organ weight of broilers from young and old breeder flocks. S**outh African Journal of Animal Science**, v. 36, 2006.

CAMPAGNOLO, R.; FRECCIA, A.; BERGMANN, R. R.; MEURER, F.; BOMBARDELLI, R. A. Óleos essenciais na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 14, n. 3, p. 565-573, 2013.

CARDA-DIÉGUEZ, M.; GHAI, R.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; AMARO, C. Metagenomics of the mucosal microbiota of European eels. **Genome Announc.**, v. 2, n. 6, p. e01132-14, 2014.

CARDOSO, L.; OWATARI, M. S.; CHAVES, F. C. M.; FERREIRA, T. H.; COSTA, D. S.; FURTADO, W. E.; MARTINS, M. L. *Lippia sidoides* essential oil at concentration of 0.25% provided improvements in microbiota and intestine integrity of *Danio rerio*. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 46, 2024.

CARARO, L.; SADO, R.; MUELBERT, B.; BORBA, M. Evaluation of oregano essential oil as a growth promoter and resistance stimulator against *Ichthyophthirius multifiliis* (Protozoa, Ciliophora) in silver catfish juveniles, *Rhamdia sp.* (Siluriformes, Heptapteridae). **Semina: Ciências Agrárias**. v. 38, p. 3871, 2017.

CARRERA-QUINTANAR, L.; LÓPEZ, R. I. R.; QUINTERO-FABIÁN, S.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, M. A.; VIZMANOS, B.; ORTUÑO-SAHAGÚN, D. Phytochemicals That Influence Gut Microbiota as Prophylactics and for the Treatment of Obesity and Inflammatory Diseases. **Mediators Inflamm**, p. 9734845, 2018.

CELI, P.; COWIESON, A. J.; FRU-NJI, F.; STEINERT, R. E.; KLUENTER, A. M.; VERLHAC, V. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, p. 88-100, 2017.

CHAVAN, P.; TUPE, S. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46, p. 115-120, 2014.

CHEN, J.; LI, Y.; SHI, W.; ZHENG, H.; WANG, L.; LI, L. Release of Cinnamaldehyde and Thymol from PLA/Tilapia Fish Gelatin-Sodium Alginate Bilayer Films to Liquid and Solid Food Simulants, and Japanese Sea Bass: A Comparative Study. **Molecules**, v. 26, p. 7140, 2021.

CHONG, J.; LIU, P.; ZHOU, G.; XIA, J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. **Nature Protocols**, v. 15, p. 799-821, 2020.

CHOWDHURY, M. A. K.; BUREU, D. P.; NG, W. K.; PONNIAH, A. G.; DEY, M. M. Producing tilapia feed locally: A low-cost option for small-scale farmers. **Flyer. WorldFish Center:Penang**, Malaysia, p. 8, 2009.

CHOWDHURY, S. MANDAL, G. P.; PATRA, A.K.; KUMAR, P.; SAMANTA, I.; PRADHAN, S.; SAMANTA, A. K. Different essential oils in diets of broiler chickens: 2. Gut microbes and morphology, immune response, and some blood profile and antioxidant enzymes. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 236, p. 39–47, 2018.

COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Res.**, p. D141-5, 2009.

DAWOOD, M.A.; GEWAILY, M. S.; SEWILAM, H. The growth performance, antioxidative capacity, and histological features of intestines, gills, and livers of Nile tilapia reared in different water salinities and fed menthol essential oil. **Aquaculture**, p. 738122, 2022(a).

DAWOOD, M. A. O.; EL BASUINI, M. F.; YILMAZ, S.; ABDEL-LATIF, H. M. R.; ALAGAWANY, M.; KARI, Z. A.; ABDUL RAZAB, M. K. A.; HAMID N. K. A.; MOONMANEE, T.; VAN DOAN, H. Exploring the Roles of Dietary Herbal Essential Oils in Aquaculture: A Review. **Animals**, v. 12, p. 823, 2022(b).

DE-SANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E.L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L.; Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-72, 2006.

SCHRYVER, P.; BOON, N.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P. The biology and biotechnology behind bioflocs. In: Avnimelech Y, editor. Biofloc technology : a practical guide book. 2nd ed. Baton Rouge, LA, USA: **World Aquaculture Society (WAS)**, p. 199–215, 2012.

SOUSA, E. L.; ASSANE, I. M.; SANTOS-FILHO, N. A.; CILLI, E. M.; DE JESUS, R. B.; PILARSKI, F. Haematological, biochemical and immunological biomarkers, antibacterial activity, and survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after treatment using antimicrobial peptide LL-37 against *Streptococcus agalactiae*, **Aquaculture**, v. 533, p. 736181, 2020.

VOS, W.; TILG, H.; VAN H. M.; CANI, P. Gut microbiome and health: mechanistic insights. **Gut**., v. 71, 2022.

DENG, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; XU, L.; WANG, Q.; FENG, J. Gut–liver immune response and gut microbiota profiling reveal the pathogenic mechanisms of vibrio harveyi in pearl gentian grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂× *E. fuscoguttatus*♀). **Front. Immunol**, v. 11, 2020.

DILER, O.; GORMEZ, O.; DILER, I.; METIN, S. Effect of oregano (*Origanum onites L.*) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquacult Nutr.**, v. 23, p. 844-851, 2017.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, p. 308-16, 2000.

EICHMILLER, J. J.; HAMILTON, M. J.; STALEY, C.; SADOWSKY, J. M.; SORENSEN, P. W. Environment shapes the fecal microbiome of invasive carp species. **Microbiome**, v. 44, n. 4, p. 1–13, 2016.

EL-HAWARRY, W. N.; MOHAMED, R. A.; SAFINAZ, A. I. Collaborating effects of rearing density and oregano oil supplementation on growth, behavioral and stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 2, p. 173-178, 2018.

FAN, L.; CHEN, J.; MENG, S.; SONG, C.; QIU, L.; HU, G. Characterization of microbial communities in intensive GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) pond systems during the peak period of breeding. **Aquac Res.**, v. 2007, n. 48, p. 459–72, 2017.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**: Sustainability in action. Rome: FAO, 2020. *E-book*. DOI: https://doi.org/10.4060/ca9229en. Disponível em: https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/170b89c1-7946-4f4d-914a-fc56e54769de/content. Acesso em: 10 mar. 2025.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture:** Towards Blue Transformation. Rome: FAO, 2022. *E-book*. DOI: https://doi.org/10.4060/cc0461en. Disponível em: https://openknowledge.fao.org/items/11a4abd8-4e09-4bef-9c12-900fb4605a02. Acesso em: 10 mar. 2025.

FAO. –**The State of World Fisheries and Aquaculture**: Blue Transformation in action. Rome: FAO, 2024. *E-book*. DOI: https://doi.org/10.4060/cd0683en. Disponível em: https://openknowledge.fao.org/items/06690fd0-d133-424c-9673-1849e414543d. Acesso em: 10 mar. 2025.

FARIAS, N. S.. **Estratégias para uso e conservação de espécies da família *Myrtaceae*: folhas de uvaia, grumixama e feijoa como fonte sustentável de compostos bioativos funcionais**. 2023 Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023.

FIRMINO, J. P.; FERNÁNDEZ-ALACID, L.; VALLEJOS-VIDAL, E.; SALOMÓN, R.; SANAHUJA, I.; TORT, L.; IBARZ, A.; REYES-LÓPEZ, F. E.; GISBERT, E. Carvacrol, Thymol, and Garlic Essential Oil Promote Skin Innate Immunity in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Through the Multifactorial Modulation of the Secretory Pathway and Enhancement of Mucus Protective Capacity. **Front Immunol.**; v. 12, n. 12, p. 633621, 2021.

FRACALOSSI, D. M.; CYRINO, J. E. P. (ed). **Nutriaqua**: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2012. 375 p.

FREITAS, T. J. **Fortificação de alimentos com óleos comestíveis microencapsulados: um estudo de patentes e de artigos**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2022.

INGERSLEV, M.; HANSEN, M.; PEDERSEN, L. B.; SKOV, S. Effects of wood chip ash fertilization on soil chemistry in a Norway spruce plantation on a nutrient-poor soil, **Forest Ecology and Management**, v. 334, p. 10-17, 2014.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21 century. *In:* FITZSIMMONS, K.; CARVALHO FILHO, J. (ed.). **Proceedings from the Fifth**

**International Symposium on Tilapia Aquaculture**. Rio de Janeiro: Panorama da Aquicultura, 2000. p. 3-8.

FIRMINO, J. P.; VALLEJOS-VIDAL, E.; BALEBONA, M. C.; RAMAYO-CALDAS, Y.; CEREZO, I. M.; SALOMÓN, R.; TORT, L.; ESTEVEZ, A.; MORIÑIGO, M. Á.; REYES-LÓPEZ, F. E.; GISBERT, E. Diet, Immunity, and Microbiota Interactions: An Integrative Analysis of the Intestine Transcriptional Response and Microbiota Modulation in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Fed an Essential Oils-Based Functional Diet. **Front. Immunol**.,v. 12, p. 625297, 2021.

FONTES, T. V.; DE OLIVEIRA, K. R. B. D.; RODRIGUES, P. B.; ROSA, P. V. E.; COSTA, D. V. D.; MARIA ORLANDO, T. M.; GOMES ALMEIDA, I. L. Digestibility of insect meals for Nile tilapia fingerlings. **Animals**, v. 9, n. 4, p. 181, 2019.

FRECCIA, A.; SOUSA, S. M. D. N.; MEURER, F.; BUTZGE, A. J.; MEWES, J. K.; BOMBARDELLI, R. A. Essential oils in the initial phase of broodstock diets of Nile tilapia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2014.

GARIBAY-VALDEZ, E.; CICALA, F.; MARTINEZ-PORCHAS, M.; GÓMEZ-REYES, R.; VARGAS-ALBORES, F.; GOLLAS-GALVÁN, T.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; CALDERÓN, K. Longitudinal variations in the gastrointestinal microbiome of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **PeerJ**, v. 2, n. 9, p. e11827, 2021.

GHOLAMI-AHANGARAN, M.; AZIZI, S.; RANGSAZ, N. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) effect on biochemical and pathological parameters of liver and kidney in chicken aflatoxicosis. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 5, p. 1-8, 2016.

GHOLAMI-AHANGARAN, M. AHMADI-DASTGERDI, A.; KARIMI-DEHKORDI, M. Thymol and carvacrol; as antibiotic alternative in green healthy poultry production. **PBP**, v. 2, n. 1, p. 22-25, 2020.

GHOLAMI-AHANGARAN, M.; AHMADI-DASTGERDI, A.; AZIZI, S.; BASIRATPOUR, A.; ZOKAEI, M.; DERAKHSHAN, M. Thymol and carvacrol supplementation in poultry health and performance. **Vet Med Sci.**, v. 8, n. 1, p. 267-288, 2021.

GIANNENAS, I.; BONOS, E.; CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI, P. Essential Oils and their Applications in Animal Nutrition. **Medicinal & aromatic plants**., v. 2, 2013.

GUPTA, A. K.; KHAN, D.; KHAN, M. Physicochemical analysis of Cinnamon Sticks (*Cinnamomum zeylanicum*) and their Pathogen & Microbial Examination. **Haya: The Saudi Journal of Life Sciences**, v. 6, n. 11, p. 295-299, 2021.

HANSEN, G. H.; OLAFSEN, J. A. Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish. **Microb Ecol.**, v. 38, n. 1, p. 1-26, 1999.

HAYASHI, C. Breves considerações sobre as tilápias. In: Ribeiro, R. P.; Hayashi, C.; Furuya, W. M. (Eds.). **Curso de piscicultura – criação racional de tilápias**, Maringá, e. 21, p. 4, 1995.

HE, W.; SAMAD, R.; LING, W.; SONG, K.; LU, K.; ZHANG, C. Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 70, p. 164 – 173, 2017.

HÖGLUND, E.; BALM, P.; WINBERG, S. Skin Darkening, A Potential Social Signal in Subordinate Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*): The Regulatory Role of Brain Monoamines and Pro-Opiomelanocortin-Derived Peptides. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 1711-21, 2000.

HONGYU, D.; ZEYUAN, T.; HUIYING, Z.; YONGQIANG, Z.; XINQIANG, C.; YUNWEI, C.; ABUDUAINI, A.; XI, Z.; ZHIXIN, W.; PEIHONG, S.; FEIYA, S.; LUODONG, H. Elucidating the effects of cumin (*Cuminum cyminum*) fruit and stem as feed additives on growth, antioxidant capacity, liver and intestinal health, and gut microbiome of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Reports**, v. 31, p. 101687, 2023.

HOSEINIFAR, S. H.; SUN, Y. Z.; WANG, A.; ZHOU, Z. Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2429, 2018.

HOSEINIFAR, S. H.; DOAN, H.; DADAR, M.; RINGOE, E.; HARIKRISHNAN, R.; 2019. **Feed Additives, Gut Microbiota, and Health in Finfish Aquaculture**, 2018.

HOSEINIFAR, S. H.; ASHOURI, G.; MARISALDI, L.; CANDELMA, M.; BASILI, D.; ZIMBELLI, A.; NOTARSTEFANO, V.; SALVINI, L.; RANDAZZO, B.; ZARANTONIELLO, M. Reducing the Use of Antibioticsin European Aquaculture with Vaccines, Functional Feed Additivesand Optimization of the Gut Microbiota. **J. Mar. Sci. Eng**., v. 12, p. 204, 2024.

HUAIQUIPÁN, R.; QUIÑONES, J.; DÍAZ, R.; VELÁSQUEZ, C.; SEPÚLVEDA, G.; VELÁZQUEZ, L.; PAZ, E. A.; TAPIA, D.; CANCINO, D.; SEPÚLVEDA, N. Review: Effect of Experimental Diets on the Microbiome of Productive Animals. **Microorganisms**, v. 11, p. 2219, 2023.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F. An update alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **Veterinary journal**. London, England, v. 187, p. 182-188, 2010.

JAMRÓZ, D.; KAMEL, C. Plant extracts enhance broiler performance. in non-ruminant nutrition: antimicrobial agents and plant extracts on immunity, health and performance. **Poult. Sci. Assoc. 91 st Annu. Meeting**, v. 80, n. 41, p. 11-14, 2002.

KANASHIRO, M. Y. **Avaliação do óleo de orégano em dietas para lambaris-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) em diferentes densidades de estocagem**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

KARPOUHTSIS, O.; PARDALI, E.; FEGGOU, E.; KOKKINI, S.; SCOURAS, Z. G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 46, p. 1111-1115, 1998.

KHAZDAIR, M. R.; GHORANI, V.; ALAVINEZHAD, A.; BOSKABADY, M. H. Pharmacological effects of *Zataria multiflora* Boiss L. and its constituents focus on their anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects. **Fundam Clin Pharmacol**., v. 32, p. 26-50, 2018.

KIM, O. S.; CHO, Y. J.; LEE, K.; YOON, S. H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S. C.; JEON, Y. S.; LEE, J. H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 62, n. 3, p. 716-721, 2012.

KIM, M.; LEE, K.; YOON, S. H.; KIM, B. S.; CHUN, J.; YI, H.; KIM, M.; LEE, K. H.; YOON, S. W.; KIM, B. S.; CHUN, J. YI, H. Analytical tools and databases for metagenomics in the next-generation sequencing era. **Genomics Inform.**, v. 11, p. 102-113, 2013.

KESBIÇ, O. S.; ACAR, U.; KESBIÇ, F. I.; YILMAZ, S. Growth performance, health status, gut microbiome, and expression of immune and growth-related genes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with pea protein replacement of fish meal, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 273, p. 110968, 2024.

KLAUS, A.; JELACIC, S.; BEATOVIC, D.; PETROVIC, T.; NIKSIC, M. Antibacterial activity of aromatic plants essential oils from Serbia against the *Listeria monocytogenes*. **Journal of Agricultural Sciences**, Belgrade,v. 54, n. 2, p. 95–104, 2009.

LAMBERT, R. J. W., SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action orégano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiolgy**, v. 91, p. 453 – 462, 2001.

LEY, R.E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n.7122, p. 1022-3, 2006.

LI, B.; ZHANG, X.; GUO, F.; WU, W.; ZHANG, T. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis, **Water Research**, v. 47, n. 13, p. 4207-4216, 2013.

LLEWELLYN, M. S.; BOUTIN, S.; HOSEINIFAR, S. H.; DEROME, N. Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

LULIJWA, R.; RUPIA, E. J.; ALFARO, A. C. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. **Rev. Aquac**., v. 12, p. 640–663, 2019.

LUZ, J. G. R.; NOGUEIRA, J. N.; ALVES, C. M. G.; VIDEIRA, M. N.; CANUTO, K. M.; CASTRO, K. N. C.; TAVARES-DIAS, M.; Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) has anthelmintic efficacy against monogenean of *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalmidae). **Aquac. Res**., p. 1-10, 2021.

LYONS, P. P.; TURNBULL, J. F.; DAWSON, K. A.; CRUMLISH, M. Effects of low-level dietary microalgae supplementation on the distal intestinal microbiome of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 4, n. 5, p. 2438–2452, 2017.

MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; MORGULIS, M. S. F. A. Broiler adaptation to post-hacting period. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 701-708, 2006.

MALATHY BR, AJITHA PS, THAMPY S. Antimicrobial activity of Commercial essential oils on human pathogens. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, p. 4440–4444, 2021.

MARCENIUK, A. P.; HILSDORF, A. W. S. **Peixes: das cabeceiras do rio Tietê e Parque das Neblinas**. Bauru: Canal 6, 2010. 160p.

MARCHESE, A.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S. F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chem**., v. 210, p. 402-14, 2016.

MELLOR, S. Herbs and spices promote health and growth. **Pig Progress**, p.18-21, 2000.
MITSCH, P.; ZITTERL-EGLSEER, K.; KÖHLER, B.; GABLER, C.; LOSA, R.; ZIMPERNIK, I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. **Poult Sci**., v. 83, n. 4, p. 669-675, 2004.

NAVARRETE, P.; TOLEDO, I.; MARDONES, P.; OPAZO, R.; ESPEJO, R.; ROMERO, J. Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. **Aquaculture Research**, v. 41, p. e667-e678, 2010.

NI, J.; YAN, Q.; YU, Y.; ZHANG, T. Fish gut microecosystem: a model for detecting spatial pattern of microorganisms. **Chin. J. Oceanol. Limnol.**, v. 32, p. 54–57, 2014.

NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; KINROSS, J.; BURCELIN, R.; GIBSON, G.; JIA, W.; PETTERSSON, S. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**., v. 336, n. 6086, 1262-1267, 2012.

NING, L.; ZHANG, X.; ZHANG, D.; HU, Y.; LI, Y. The benefits of blend essential oil for GIFT tilapia on the digestion, antioxidant, and muscle quality during cold storage, **Aquaculture**, v. 533, p. 736097, 2021.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov.**, v. 7, n. 1, p. 28-35, 2012.

NOVRIADI, R.; HERMAN, S. M.; STEVEN, K. Supplementation effect of dietary carvacrol and thymol polyphenols from oregano *Origanum vulgare* on growth performance and health condition of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research**, v. 24, n. 1, p. 27-39, 2023.

OBIRIKORANG, K. A.; AMISAH, S.; EGNA, H.; GYAMFI, S.; FRIMPONG, E.; EDZIYIE, R. E.; QUAGRAINIE, K.; GOODE, M. E. Effect of soybean meal diets on the growth performance, ammonia excretion rates, gut histology and feed cost of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, v. 51, n. 9, p. 3520–3532, 2020.

OETTING, L. L.; UTIYAMA, C. E.; GIANI, P. A.; RUIZ, U. S.; MIYADA, V. S. Effects of herbal extracts and antimicrobials on apparent digestibility, performance, organs morphometry and intestinal histology of weanling pigs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1389-1397, 2006.

OLIVARES-RUBIO, H. F.; VEGA-LÓPEZ, A. Fatty acid metabolism in fish species as a biomarker for environmental monitoring. **Environ Pollut**., v. 218, p. 297-312, 2016.

PAN, J.; YULIN, Z.; MOHAMED, A. A. S.; CHANGZHU, L.; HAIYING, C.; LIN, L. Biological properties of essential oil emphasized on the feasibility as antibiotic substitute in feedstuff, **Grain & Oil Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 10-23, 2023.

PEIXE BR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura:** São Paulo: Peixe BR, 2024. Disponível em: https://www.peixebr.com.br/anuario-2024/. Acesso em: 10 mar. 2025.

PEI, R.S.; ZHOU, F.; JI, B.P.; XU, J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. **J. Food Sci**., v. 74, p. 379–383, 2009.

PEREIRA, J.; MARTINS, A.; ROCHA, M.; JÚNIOR, S.; FEITOSA, C. Medicinal species from Brazil with anti-inflammatory or antioxidant potential: A review. **Research, Society and Development**, v. 10, p. e10310716196, 2021.

PHROMPANYA, P.; SAENPHET, K.; SAENPHET, S. Comparative histochemical study of the gastrointestinal tracts of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the hybrid catfish (*Clarias batrachus* x *Clarias gariepinus*), **Acta Histochemica**, v. 121, n. 3, p. 261-267, 2019.

PICHLER, M.; COSKUN, Ö. K.; ORTEGA-ARBULÚ, A. S.; CONCI, N.; WÖRHEIDE, G.; VARGAS, S.; ORSI, W. D. A. 16S rRNA gene sequencing and analysis protocol for the *Illumina MiniSeq* platform. **Microbiologyopen**, v. 7, n. 6, p. e00611, 2018.

PU, J.; CHEN, D.; TIAN, G.; HE, J.; ZHENG, P.; MAO, X.; YU, J.; HUANG, Z.; LUO, J.; LUO, Y.; YU, B. Effects of benzoic acid, *Bacillus coagulans* and oregano oil combined supplementation on growth performance, immune status and intestinal barrier integrity of weaned piglets, **Animal Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 152-159, 2020.

RAMOS, M. A.; GONÇALVES, J. F. M.; COSTAS, B.; BATISTA, S.; LOCHMANN, R.; PIRES, M. A.; REMA, P.; OZÓRIO, R. O. A. Commercial *Bacillus* probiotic supplementation of rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*): growth, immune responses and intestinal morphology. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 5, p. 2538-2549, 2017.

RANASINGHE, P.; PIGERA, S.; PREMAKUMARA, G. A.; GALAPPATHTHY, P.; CONSTANTINE, G. R.; KATULANDA, P. Medicinal properties of 'true' cinnamon

(*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. **BMC Complement Altern Med**., v. 22, p. 13:275, 2013. doi: 10.1186/1472-6882-13-275. PMID: 24148965; PMCID: PMC3854496.
RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Potential of Chinese chive oil as a natural antimicrobial for controlling *Flavobacterium columnare* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisheries Science**, v. 75, p. 1431-1437, 2009.

RINGØ, E.; ZHOU, Z.; GONZALEZ VECINO, J. L. Effects of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals: a never-endingstory? **Aquacult Nutr**., v. 22, p. 219-282, 2016.

ROLDÁN-JUAREZ, J.; PINARES, R.; SMITH, C. E.; LLERENA, C. A.; MACHACA, V.; PIZARRO, D. M. Microencapsulated essential oils influence the growth and foregut histomorphometry of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings, **Veterinary and Animal Science**, v. 22, p. 100316, 2023.

RÚA, J.; DEL VALLE, P.; DE ARRIAGA, D.; FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, L.; GARCÍA-ARMESTO, M. R. Combination of carvacrol and thymol: antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity. **Foodborne Pathog Dis**., v. 16, n. 9, p. 622-629, 2019.

SÁNCHEZ-MUROS, M. J.; SÁNCHEZ, B.; BARROSO, F. G.; GARCÍA-MESA, S.; RUFINO-PALOMARES, E. E.; LUPIÁÑEZ, J. Á.; SANZ, A. Effects of culture densities on feed demand, behavioural tests and on the hepatic and cerebral oxidative status in tilapia (*Oreochromis sp*.), **Applied Animal Behaviour Science**, v. 185, p. 137-145, 2016.

SARGENT, J. R.; BELL, J. G.; BELL, M.V.; HENDERSON, R.J; TOCHER, D.R. Requirement criteria for essential fatty acids. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 11 p. 183-198, 1995.

SALEHI, B.; SHARIFI-RAD, J.; QUISPE, C.; LLAIQUE, H.; VILLALOBOS, M.; SMERIGLIO, A.; TROMBETTA, D.; EZZAT, S. M.; SALEM, M. A.; ZAYED, A.; CASTILLO, C. M. S.; YAZDI, S. E.; SEN, S.; ACHARYA, K.; SHAROPOV, F.; MARTINS, N. Insights into *Eucalyptus genus* chemical constituents, biological activities and health-promoting effects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 609-624, 2019.

SALIH, F. M.; ABDULLAH, T. A.; KHDER, S. K.; IBRAHIM, D. A. S. Antibacterial effect of fixed and volatile oils against gram-positive and gram-negative bacteria. **Kurdistan Journal of Applied Research**, v. 4, n. 2, p. 74–87, 2019.

SEMOVA, I.; CARTEN, JD.; STOMBAUGH, J.; MACKEY, L. C.; KNIGHT, R.; FARBER, S. A.; RAWLS, J. F. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish, **Cell Host & Microbe, Elsevier Inc**., v. 12, p. 277-288, 2012.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. **PLoS Biol**., v. 14, n. 8, p. e1002533, 2016.

SHELTON, W. L. Tilapia culture in the 21st century. **R.D. Guerrero III**, p. 1-28, 2002.

SCHROEDER, B. O.;BÄCKHED, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. **Nat Med**., v. 22, n. 10, p. 1079-1089, 2016.

SILVA, A. S. M.; SILVA, E. G. Encapsulação de óleos essenciais para aplicação em alimentos: uma revisão. **Instituto Internacional Despertando Vocações**, p. 569–585, 2020.

SIVROPOULOU, A.; APANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKI, M. Antimicrobial and cytoxic activities of Origanum essential oils. **Journal of Agriculturas and Fod Chemistry**, v. 44, p. 1202 – 1205, 1996.

SIDIROPOULOU, E.; GRIGORIADOU, K.; LAZARI, D.; MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V.; PAPAGRIGORIOU, T.; AGUIAR-MARTINS, K.; TZORA, A.; BONOS, E.; BLAKE D. P.; SKOUFOS, I.; GIANNENAS, I.; FOTOU, K. *In vitro* antioxidant, antimicrobial, anticoccidial, and anti-inflammatory study of essential oils of oregano, thyme, and sage from epirus, Greece. **Life**, v. 12, n. 11, p. 1783, 2022..

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136–141, 2012..

SOUZA, E.; STAMFORD, T.; LIMA, E.; TRAJANO, V.; BARBOSA-FILHO, J. Antimicrobial effectiveness of spices: An approach for use in food conservation systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, 2005.

SÖNMEZ, A.; BILEN, S.; ALAK, G.; HISAR, O.; YANIK, T.; BISWAS, G. Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 165-176, 2014.

SUN, J.; WANG, M.; KAN, Z. Causal relationship between gut microbiota and polycystic ovary syndrome: a literature review and Mendelian randomization study. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, 2024.

SUPHORONSKI, S. A.; CHIDEROLI, R. T.; FACIMOTO, C. T.; MAINARDI, R. M.; SOUZA, F. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; JESUS, G. F. A.; MARTINS, M. L.; DI SANTIS, G. W.; DE OLIVEIRA, A.; GONÇALVES, G. S.; DARI, R.; FROUEL, S.; PEREIRA, U. P. Effects of a phytogenic, alone and associated with potassium diformate, on tilapia growth, immunity, gut microbiome and resistance against francisellosis. **Sci Rep**., v. 9, p. 6045, 2019.

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

SUTILI, F. J.; GATLIN III, D. M.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 3, p. 716-726, 2018.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochem J.**, v. 474, n. 11, p. 1823-1836, 2017.

TSEGAY, T.; NATARAJAN, P. Analysis of diet and biochemical composition of Nile tilapia (*O. niloticus*) from tekeze reservoir and lake hashenge, Ethiopia. **Journal of Fisheries & Livestock Production**, v. 4, 2016.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl Environ Microbiol**., v. 4, p. 1561-1568, 2002.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 10, p. 486-503, 2011.

VALLADÃO, G.; GALLANI, S.; PALA, G.; KOTZENT, J. R. S.; COSTA, J.; SILVA, T.; PILARSKI, F. Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. **Aquaculture Research**, 2017.

VARGAS-ALBORES, F.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; CICALA, F.; LAGO-LESTÓN, A.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M. Therapeutic modulation of fish gut microbiota, a feasible strategy for aquaculture. **Aquaculture**, v. 544, p. 737050, 2021.

VERONEZI, C. M.; SILVA, A. C.; JORGE, N.; FREITAS IR. Óleos vegetais: Propriedades físico-químicas, bioativas e antioxidantes. **Academia Agroalimentar**, 2022.

VORSTE, V. R.; SARREMEJANE, R.; DATRY, T. Intermittent Rivers and Ephemeral Streams: A Unique Biome With Important Contributions to Biodiversity and Ecosystem Services. **Encyclopedia of the World's Biomes**, 2020.

WARD, A. K.; CLASSEN, H. L.; BUCHANAN, F. C. Fishy-egg tainting is recessively inherited when brown-shelled layers are fed canola meal. **Poult. Sci.**, v. 88, n.4, p. 714-721, 2009.

WEINROTH, M. D.; BELK, A. D.; DEAN, C.; NOYES, N.; DITTOE, D. K.; ROTHROCK, M. J.; RICKE, S. C.; MYER, P. R.; HENNIGER, M. T.; RAMÍREZ, G. A.; OAKLEY, B. B.; SUMMERS, K. L.; MILES, A. M.; AULT-SEAY, T. B.; YU, Z.; METCALF, J. L.; WELLS, J. E. Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies. **Journal of animal science**, v. 100, n.2, 2022.

WIERTSEMA, S. P.; VAN BERGENHENEGOUWEN, J.; GARSSEN, J.; KNIPPELS, L. M. J. The interplay between the gut microbiome and the immune system in the context of infectious diseases throughout life and the role of nutrition in optimizing treatment strategies. **Nutrients**, v. 13, p. 886, 2021.

XU, R.; XIAO, X.; ZHANG, S.; PAN, J.; TANG, Y.; ZHOU, W.; JI, G.; DANG, Y. The methyltransferase METTL3-mediated fatty acid metabolism revealed the mechanism of cinnamaldehyde on alleviating steatosis, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113367, 2022.

YEOMAN, C. J.; CHIA, N.; JERALDO, P.; SIPOS, M.; GOLDENFELD, N. D.; WHITE, B. A. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract, **Anim Health Res Rev**., v. 13, n. 1, p. 89-99, 2012.

YEOMAN, C. J.; WHITE, B. A. Gastrointestinal tract microbiota and probiotics in production animals, **Annu Rev Anim Biosci**., v. 2, p. 469-486, 2014.

YOUSEFI, M.; GHAFARIFARSANI, H.; HOSEINI, S. M.; HOSEINIFAR, S. H.; ABTAHI, B.; VATNIKOV, Y. A.; KULIKOV, E. V.; DOAN, H. V. Effects of dietary thyme essential oil and prebiotic administration on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) welfare and performance, **Fish & Shellfish Immunology**, v. 120, p. 737-744, 2022.

ZAMINHAN-HASSEMER, M.; ZAGOLIN, G. B.; PERAZZA, C. A.; BARBOSA, D. A.; MENEGIDIO, F. B.; COUTINHO, L. L.; TIZIOTO, P.; HILSDORF, A. W. S. Adding an essential oil blend to the diet of juvenile Nile tilapia improves growth and alters the gut microbiota, **Aquaculture**, v. 560, p. 738581, 2022.

ZESHAN, M. Q. Antimicrobial activity of essential oils of Curcuma longa and *Syzygium aromaticum* against multiple drug-resistant pathogenic bacteria. **Tropical Biomedicine**, v. 40, n. 2, p. 174–182, 2023.

ZEPPENFELD, D.; SIMON, M.; HASWELL, J.; D'ABREO, D.; MURCHISON, C.; QUINN, J. Association of perivascular localization of aquaporin-4 with cognition and Alzheimer disease in aging brains. **JAMA Neurol**., v. 74, p. 91–99, 2017.

ZEYTUN, H.; ÖZKORKMAZ, E. G. Effects of carvacrol in an experimentally induced esophageal burn model: Expression of VEGF and Caspase-3 proteins. **J Invest Surg**., p. 1–9, 2019.

ZHANG, M.; SUN, Y.; LIU, Y.; QIAO, F.; CHEN, L.; LIU, W. T.; DU, Z.; LI, E. Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference. **Aquaculture**, v. 454, p. 72–80, 2016.

ZHANG, R.; WANG, X. W.; LIU, L. L.; CAO, Y. C.; ZHU, H. Dietary oregano essential oil improved the immune response, activity of digestive enzymes, and intestinal microbiota of the koi carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 518, p. 734781, 2020.

ZHANG, Z.; FAN, Z.; YI, M.; LIU, Z.; KE, X.; GAO, F.; CAO, J.; WANG, M.; CHEN, G.; LU, M. Characterization of the core gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): indication of a putative novel *Cetobacterium* species and analysis of its potential function on nutrition. **Arch Microbiol.**, v. 204, n. 12, p. 690, 2022.

ZHAO, X.; CHEN, X.; CHEN, H.; LIU, C.; YANG, M. Composition analysis and toxigenic fungi isolation on the surface of Polygala Radix in China. **Research Square**, 2023.

ZHENG, Z.; TAN, J.; LIU, H. Y.; ZHOU, X.; XIANG, X.; WANG, K. Y. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, p. 214-218, 2009.

ZHOU, F.; JI, F.; ZHANG, H.; JIANG, H.; YANG, Z.; LI, J.; LI, J.; REN, Y.; YAN, W. Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1704-1709, 2007.

ZONG-XIAN, Z.; YIN-YI, Y.; CHUN-HUI, A.; GAN, Y.; XUE-YING, L.; TONG-DE, L.; MENG, L. H.; JUN-HONG, X. Dietary supplementation of Patchouli oil increases the resistance against *Streptococcus agalactiae* infection in GIFT tilapia as revealed by transcriptome and 16s amplicon profiling. **Aquaculture Reports**, v. 33, p. 101754, 2023.