

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP

POTENCIAL USO DA *ARTEMISIA ANNUA* NA AQUICULTURA

Michelly Pereira Soares

São Carlos-SP  
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP

POTENCIAL USO DA *ARTEMISIA ANNUA* NA AQUICULTURA

Michelly Pereira Soares

Orientador: Dr. Francisco Tadeu Rantin

Co-orientadores: Dr.<sup>a</sup> Fernanda Garcia Sampaio

Dr. Claudio Martín Jonsson

“Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP da Universidade Federal de São Carlos, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas”.

São Carlos-SP  
2021



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Michelly Pereira Soares, realizada em 28/04/2021.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin (UFSCar)

Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro (UFSCar)

Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati (UNESP)

Profa. Dra. Cristiane Fatima Meldau de Campos Amaral (UEMS)

Profa. Dra. Marcia Mayumi Ishikawa (EMBRAPA)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

*Aos meus pais (Elsa Pereira Soares e Suely Maria da Silva Soares)  
e irmãos (Mayara Pereira Soares e Ana Maria Pereira Soares) pelos  
incentivos e esforços realizados para que eu continuasse  
estudando. A todos que, de alguma forma, tornaram possível a  
realização de um objetivo/sonho.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

São inúmeras as pessoas que fazem parte dessa tese, algumas nem mesmo sabem, mas são tijolinhos dessa construção. Agradeço a meus pais Elso e Suely, irmãs Mayara e Ana Maria por serem sempre minha base de sustentação, pelo apoio e amor incondicional. A meu companheiro Talisson Chaves, por todo incentivo, horas de estudo juntos e por me motivar a ser melhor sempre. Amo vocês!

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, Dra. Fernanda Garcia Sampaio e Dr. Claudio Martin Jonsson, pela oportunidade, apoio, orientação, confiança, amizade, dedicação e paciência. A orientação de vocês tem contribuído para meu crescimento científico e pessoal. Em especial a você Fernanda, quem me ajudou a construir este trabalho, por estar disponível sempre, e a qualquer momento que precisei.

Agradeço a todos os envolvidos na colaboração entre Embrapa Meio Ambiente Jaguariúna - SP e Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp Paulínia – SP, pela estrutura, apoio na realização dos experimentos e conhecimento transmitido, a atenção e contribuição de cada envolvido foi crucial para conclusão deste trabalho, pois ciência é construção coletiva.

Aos amigos que dividiram comigo todas as angústias do doutorado, todos os créditos a serem cumpridos, todos os trabalhos a serem feitos, congressos, palestras, simpósios e tantas outras coisas que edificaram essa formação. Agradeço pelos momentos difíceis compartilhados, mas principalmente os momentos de descontração e risadas que me proporcionaram. A todas as outras amigas que construí ao longo dessa trajetória, meu muito obrigada. Saibam que o doutorado não será o mesmo sem vocês aqui.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001, pela bolsa concedida.

Eu agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização da minha formação e participaram de todos os momentos bons e os difíceis. Meus agradecimentos e carinho eterno a todos.

## RESUMO

A piscicultura no Brasil tem apresentado um grande crescimento nos últimos anos, relacionado principalmente ao excelente potencial de algumas espécies cultivadas na produção intensiva e na grande aceitação destes produtos pelo mercado consumidor. O aumento e intensificação dos sistemas de produção de peixes demanda cultivo em alta densidade e a adoção de diferentes tecnologias de manejos, que por um lado resultam em excelentes ganhos de produção, mas que, por outro, podem submeter os animais a estresse demandando maior eficiência do sistema imune. Com o aparecimento de diferentes tipos de doenças, os piscicultores necessitam cada vez mais utilizar quimioterápicos e antibióticos para conter o avanço de doenças comuns aos sistemas intensificados de produção. Além disso, os antibióticos são usados como promotores de crescimento, que geram excelentes resultados, mas seu uso tem sido cada vez mais limitado para este fim, pois o uso inadequado ou indiscriminado pode gerar impacto negativo tanto nos peixes quanto no ambiente. Diante disto, nos últimos anos, produtos de origem natural têm sido estudados quanto à capacidade de estimulação do sistema imunológico e controle de principais doenças no cultivo de peixes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de *Artemisia annua*, uma planta medicinal facilmente encontrada no Brasil, como agente antiestresse, imunoestimulante, promotor de crescimento, antibacteriano e terapêutico. A utilização da formulação de ração contendo suplementação com extrato alcoólico de *A. annua* proporciona melhoria na conversão alimentar, maior crescimento, melhora do sistema imune e minimiza a resposta ao estresse dos peixes de cultivo, melhorando a resistência frente as principais bactérias que acometem a espécie. Além disso, componentes bioativos do extrato e frações alcoólicas de *A. annua* apresentam potencial eficácia para inibir o crescimento e eliminar *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare*, e podem ser aplicados no tratamento de infecções bacterianas. Os resultados deste estudo contribuem com o desenvolvimento de bioprodutos para o uso na piscicultura, colaborando com o fortalecimento e a consolidação da produção, de grande importância econômica. Portanto, espera-se com os resultados gerados contribuir para redução das perdas econômicas em decorrência de altas taxas de mortalidade na piscicultura resultantes de doenças e evitar a dependência da utilização de quimioterápicos e antibióticos sintéticos.

**Palavras-chave:** Aditivos naturais; Extrato alcoólico; Artemisinina; Bactérias patogênicas de peixes; Imunoestimulantes fitoterápicos; Promotor de crescimento

## ABSTRACT

Fish farming in Brazil has shown great growth in recent years, mainly related to the excellent potential of some species grown in intensive production and the great acceptance of these products by the consumer market. The increase and intensification of fish production systems requires high-density cultivation and the adoption of different management technologies, which on the one hand result in excellent production gains, but which, on the other hand, can subject animals to stress demanding greater efficiency of the immune system. With the appearance of different types of diseases, fish farmers increasingly need to use chemotherapy and antibiotics to stem the spread of diseases common to intensified production systems. In addition, antibiotics are used as growth promoters, which generate excellent results, but their use has been increasingly limited for this purpose, as inappropriate or indiscriminate use can have a negative impact on both fish and the environment. In view of this, in recent years, products of natural origin have been studied for their ability to stimulate the immune system and control the main diseases in fish farming. Thus, the objective of this work was to evaluate the use of *Artemisia annua*, a medicinal plant easily found in Brazil, as an anti-stress agent, immunostimulant, growth promoter, antibacterial and therapeutic. The use of a feed formulation containing supplementation with alcoholic extract of *A. annua* improves feed conversion, increases growth, improves the immune system and minimizes the stress response of farmed fish, improving resistance to the main bacteria that affect the species. Also, bioactive components of the extract and alcoholic fractions of *A. annua* have the potential to inhibit growth and eliminate *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* and *Flavobacterium columnare*, and can be applied in the treatment of bacterial infections. The results of this study contribute to the development of bioproducts for use in fish farming, collaborating with the strengthening and consolidation of production, of great economic importance. Therefore, it is hoped with the results generated contribute to the reduction of economic losses due to high mortality rates in fish farming resulting from diseases and to avoid dependence on the use of chemotherapeutic agents and synthetic antibiotics.

**Keywords:** Natural additives; Alcohol extract; Artemisinin; Fish pathogenic bacteria; Herbal immunostimulants; Growth promoter

## SUMÁRIO

CAPITULO I - Introdução geral .....	9
1. Considerações gerais.....	10
2. Objetivos .....	12
3. Revisão de Literatura .....	15
3.1. Estresse em peixes .....	15
3.2. Estresse e imunidade.....	17
3.3. Sistema oxidativo / antioxidante .....	18
3.4. Fitoterápicos: princípios ativos extraídos de plantas com potencial de uso na aquicultura.....	21
3.5. <i>Artemisia annua</i> .....	22
3.6. Espécie estudada: tilápia-do-Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	24
4. Referências Bibliográficas.....	26
CAPITULO II - Atividade antibacteriana in vitro do extrato etanólico de <i>Artemisia annua</i> e suas frações bioativas contra patógenos de peixes .....	36
CAPITULO III - Efeitos do extrato alcoólico de <i>Artemisia annua</i> na imunidade fisiológica e inata da tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) para melhorar o estado de saúde.....	53
CAPITULO IV - Efetividade do extrato alcoólico de <i>Artemisia annua</i> no desempenho e morfologia intestinal da tilápia do Nilo .....	87
CAPITULO V - Desenvolvimento de método para determinação de artemisinina em músculo de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) por QuEChERS modificado combinado com microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução .....	108
CAPITULO VI - Considerações Finais .....	140



# CAPÍTULO I

---

## Introdução geral



## 1. Considerações gerais

O crescimento da piscicultura no Brasil está relacionado à intensificação da produção, que preconiza sistemas com altas densidades de estocagem, fornecimento de altas quantidades de ração e diferentes tipos de manejos, que são críticos para o aumento e/ou ocorrência de doenças e infecções nos peixes (CYRINO et al., 2010). Como estratégia para minimizar as perdas por doenças bacterianas, antibióticos como o florfenicol, a acriflavina, a oxitetraciclina, o cloranfenicol, os inseticidas benzoiluréia diflubenzuron (dimilin) e o triflumuron, e quimioterápicos como os organofosforados, como por exemplo a alsystin (malation), o neguvon (triclorfon) e o folidol (metil-paration) têm sido amplamente utilizados para controlar agentes infecciosos, podendo ser adicionados à ração ou diretamente na água (LOPES et al., 2005; BELEM-COSTA & CYRINO, 2006). A suplementação alimentar com antibióticos tem sido usada como promotora de crescimento e gera excelentes resultados para melhorar o crescimento e a eficiência alimentar dos peixes (Reda et al., 2013; HE et al., 2017), mas seu uso tem sido cada vez mais limitado para este fim.

Na produção animal há uma forte tendência mundial quanto à limitação e proibição da suplementação de determinadas classes de antibióticos e quimioterápicos. Estes compostos, quando utilizados em dosagens subterapêuticas, com uso prolongado ou constante, podem proporcionar resistência de bactérias patogênicas, ocasionando riscos consideráveis ao animal e principalmente para a saúde humana (YOUSEFIAN & AMIRI, 2009). Além disso, a utilização inadequada desses produtos pode ocasionar mutagênese e carcinogênese, acúmulo de resíduos em órgãos e tecidos humanos e de animais, assim como gerar poluentes ao ambiente (MENTEN, 2001; MOTA et al., 2005).

Em função dos problemas relatados anteriormente, a União Europeia banuiu o emprego de vários antibióticos e quimioterápicos na alimentação animal (CASEWELL et al., 2003). Além disso, existe o apelo dos consumidores conscientes pela qualidade alimentar, preocupados em consumir produtos livres de terapêuticos sintéticos e produtos químicos (BOSCOLO et al., 2012). Dessa forma, os medicamentos fitoterápicos têm recebido atenção especial na

produção animal, destacando-se a utilização de produtos naturais que tenham atividade antimicrobiana contra agentes patogênicos em suínos e aves, podendo ser também uma excelente estratégia para a piscicultura.

A produção de peixes exige um maior controle, com fornecimento de dietas balanceadas e melhoria nas condições de saúde. O uso de princípios ativos extraídos de plantas é uma alternativa para melhorar o sistema imune destes animais, reduzindo problemas com estresse e surgimento de doenças (RINGO et al., 2010). Portanto, pesquisas nessa área precisam ser incentivadas, principalmente com espécies que possuem grande importância econômica como a tilápia. Vários estudos têm mostrado a eficiência de algumas plantas na estimulação de respostas imunológicas e proteção contra infecção bacteriana em várias espécies de peixes (YIN et al., 2009; ZANUZZO et al., 2012; ZANUZZO et al., 2017). Neste sentido, o presente projeto de pesquisa focou no desenvolvimento de tecnologia para o aproveitamento sustentável da biodiversidade de produtos vegetais e na geração de bioprodutos (fármacos, fitoterápicos, etc.) com aplicação na piscicultura.

O desenvolvimento da aquicultura depende de um número grande de fatores, entre eles a tomada de decisão sobre o tipo de fármaco a ser empregado e dos possíveis riscos para a saúde ambiental e do consumidor. Assim, são necessários estudos que demonstrem a sua eficácia, a toxicidade e os possíveis efeitos sobre os organismos de criação a serem expostos aos fitoterápicos. Diante disto, é fundamental que se estabeleçam dados sobre bases fisiológicas dos peixes expostos a estes fármacos, para melhor compreensão das respostas que interferem na saúde do animal, além de medidas para proporcionar bem-estar e menor impacto ambiental da atividade.

No desenvolvimento de bioprodutos, plantas com propriedades medicinais que possam ser usadas para evitar perdas de produtividade em piscicultura devem ser estudadas para avaliar seu amplo espectro de ação (ação antibacteriana, redutores de estresse, moduladores do sistema imunológico, promotores de crescimento e terapêuticos) para testar sua eficácia, elaborar métodos para otimizar seu uso e oferecer ao mercado. Os patógenos têm mostrado impactos notáveis na aquicultura em todo o mundo, incluindo perdas de aproximadamente 20% da produção (SITJÀ-BOBADILLA &

OIDTMANN, 2017). Portanto, é necessário testar a eficácia de produtos inovadores, ecologicamente corretos, que possam combater as doenças bacterianas, melhorar a resistência imunológica, o desempenho de crescimento e reduzir o estresse dos peixes cultivados, melhorando, assim, a produtividade crescente e a sustentabilidade da indústria de aquicultura, evitando a dependência da utilização de quimioterápicos e antibióticos sintéticos.

## 2. Objetivos

O objetivo desta tese foi avaliar se a planta *Artemisia annua* é um agente alternativo promissor para melhorar a produção e o controle de doenças bacterianas em peixes cultivados. Avaliamos a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato alcoólico de *A. annua* e seus componentes bioativos contra *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare*, as principais bactérias que afetam a piscicultura. A espécie selecionada para estudo *in vivo* foi a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), segunda espécie de peixe mais cultivada no mundo. Avaliamos os efeitos da suplementação dietética do extrato alcoólico de *A. annua* no desempenho de crescimento e histomorfometria do intestino, nos indicadores de estresse, hematológicos, imunológicos e resistência da tilápia do Nilo frente a um desafio bacteriano com *A. hydrophila*. Além disso, um método analítico para quantificar a artemisinina (principal componente ativo de *A. annua*) em músculos de tilápia foi desenvolvido e validado. Para atingir tais metas, foram estabelecidos 4 objetivos específicos:

1) Avaliar se a artemisinina comercial, o extrato alcoólico de *A. annua* e seus componentes bioativos possuem ação antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare*, as principais bactérias que afetam os peixes de cultivo.

2) Testar se a suplementação dietética com extrato alcoólico de *A. annua* melhora os parâmetros hematológicos, de estresse, imunológicos e estresse oxidativo de juvenis de tilápia do Nilo e aumenta a resistência a doenças quando peixes são expostos a *A. hydrophila*.

3) Avaliar se a suplementação dietética com extrato alcoólico de *A. annua* melhora o desempenho de crescimento e a morfologia intestinal da tilápia do Nilo.

4) Desenvolver e validar um método analítico para quantificar a artemisinina em músculos de tilápia seguindo as diretrizes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Diretriz da Comunidade Europeia para avaliação do potencial acúmulo de resíduos de medicamentos.

O trabalho está dividido em seis capítulos: Capítulo 1, onde é feita uma introdução geral aos diferentes tópicos abordados na tese; os capítulos 2 a 5 apresentam os resultados estruturados em artigos científicos e o capítulo 6 apresenta as conclusões obtidas. A descrição de cada capítulo está resumida abaixo:

Capítulo 1: Introdução geral: contextualização do trabalho que descreve o estresse em peixes cultivados imposto pela produção e suas mudanças fisiológicas para lidar com os desafios, o uso de fitoterápicos na aquicultura e da planta *A. annua*, além da espécie de peixe em estudo, tilápia do Nilo.

Capítulo 2: Atividade antibacteriana *in vitro* do extrato alcoólico de *Artemisia annua* e suas frações bioativas contra patógenos de peixes: Neste estudo, o efeito antibacteriano *in vitro* da *Artemisia annua* e seus componentes bioativos foram avaliados contra as principais bactérias que afetam a piscicultura: *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare*. Os indicadores avaliados foram concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC). Este estudo foi publicado como short communication na Aquaculture Research.

Capítulo 3: Efeitos do extrato alcoólico de *Artemisia annua* na fisiologia e imunidade inata da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para melhorar o estado de saúde: Neste capítulo, o efeito da suplementação de extrato alcoólico de *A. annua* foi estudado em juvenis de tilápia do Nilo. Os indicadores avaliados foram os níveis plasmáticos de glicose e cortisol, atividade respiratória dos leucócitos, proteína plasmática total, níveis de lisozima sérica,

bem como o número de hemácias e leucócitos circulantes no sangue de peixes ao final dos 30 dias de alimentação (fase I) e 24h após exposição a bactérias *A. hydrophila* (fase II). Os níveis de peroxidação lipídica, atividade da catalase e glutathione S-transferase no fígado dos peixes também foram analisados. Este estudo foi publicado na *Fish and Shellfish Immunology*.

Capítulo 4: Eficiência do extrato alcoólico de *Artemisia annua* no desempenho e morfologia intestinal da tilápia do Nilo: Nesta etapa foi estudado o efeito da suplementação de extrato alcoólico de *A. annua* no desempenho de crescimento e morfologia intestinal de juvenis de tilápia do Nilo. Foram avaliados o ganho de peso, a taxa de crescimento específico, a taxa de conversão alimentar, a taxa de eficiência de proteína, o perímetro, a altura e a espessura das vilosidades intestinais, profundidade das criptas, relação vilosidade:cripta e o número de células caliciformes por vilosidade.

Capítulo 5: Desenvolvimento de método para determinação de artemisinina em músculo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por QuEChERS modificado combinado com microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução: Neste trabalho um método analítico para quantificar a artemisinina em músculos de tilápia foi desenvolvida e validado, com resultados confiáveis e baixo consumo de solventes e reagentes.

Capítulo 6: Considerações finais: Este capítulo discute os resultados obtidos ao longo de toda a tese de forma integrativa e resume os principais destaques do trabalho.

### 3. Revisão de Literatura

#### 3.1. Estresse em peixes

O estresse pode ser definido como uma cascata de eventos fisiológicos que ocorre quando um organismo tenta recuperar a homeostase diante de um perigo identificado, uma condição em que o equilíbrio do organismo é perturbado e as subsequentes alterações neurais, hormonais, metabólicas, iônicas e imunológicas (WENDEELAR-BONGA, 1997; DE FARIA et al., 2021). Os peixes são animais ectotérmicos e de vida aquática, como outros animais, são constantemente e regularmente submetidos a mudanças ambientais externas e internas, com as quais enfrentam constantes desafios, que vão desde os aspectos físico-químicos da água, conflitos entre os animais dominantes dentro da população / conflitos sociais, entre outros (URBINATI et al., 2020). Na aquicultura, estas condições são somadas as condições impostas pela produção, como, por exemplo, manejo, transporte e altas densidades de estocagem que, dependendo de sua origem, intensidade e duração, superam sua capacidade de tolerância, ameaçando sua saúde, bem-estar e sobrevivência, podendo levar ao aparecimento de doenças e mortalidade de lotes inteiros, gerando perdas econômicas significativas (RAHMAN et al., 2001; BEN HAMED et al., 2018; URBINATI et al., 2020).

Para garantir a sobrevivência, os peixes precisam encontrar meios de lidar com estes desafios para superar as situações desfavoráveis. As mudanças fisiológicas, hematológicas, imunológicas e comportamentais desencadeadas quando o peixe reage a desafios são comumente referidos como respostas ao estresse (YADA & TORT, 2016; URBINATI et al., 2020). As respostas de estresse são divididas em três categorias: primária, secundária e terciária (MAZEAUD et al., 1977; WEDEMEYER & MCLEAY, 1981). As hormonais são as respostas primárias, mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos são as secundárias e as terciárias são o comprometimento do crescimento e aumento de doenças. Os indicadores mais utilizados na avaliação do estresse, são o cortisol plasmáticos (resposta primária) e a glicose (resposta secundária) (ROBERTSON et al., 1987; BARTON, 2000).

Os parâmetros que constituem o eritrograma, em especial o número de eritrócitos e a concentração de hemoglobina, são respostas secundárias que

refletem a capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, evidenciando a exigência de energia do animal em situação adversa (HOUSTON, 1997). A elevação dos níveis de glicose plasmática e cortisol indicam a condição de estresse e a necessidade de energia para suportar a situação desfavorável. Este aumento tem origem glicogenolítica proveniente da ação dos corticosteróides e catecolaminas, um indicador confiável de estresse em peixes (MOMMSEN et al., 1999). Elevadas concentrações de cortisol podem causar gliconeogênese e glicogenólise no fígado, que resulta em hiperglicemia e ajuda a satisfazer este aumento na demanda de energia, durante o estresse, permitindo que o organismo reaja ao agente estressor (IWAMA, 1998).

Como os eritrócitos são constituintes da série vermelha sanguínea e contém hemoglobina, cuja função é o transporte de oxigênio das brânquias até os tecidos, qualquer deficiência em número ou forma dos eritrócitos pode comprometer a oxigenação nos tecidos (RANZANI-PAIVA et al., 2004). Porém, ao diminuir o número de eritrócitos em conjunto com o aumento do seu volume resulta em uma espécie de compensação para o transporte de O<sub>2</sub> pela hemoglobina (TAVARES-DIAS, 2002). O hematócrito representa o percentual de glóbulos vermelhos em relação ao volume de sangue correspondente, e seu aumento pode ser relacionado a condições estressantes, entre outros (BARTON, 2000; BRANDÃO et al., 2006). Esse parâmetro pode, em parte, revelar o nível de estresse a que os peixes estão submetidos, embora possa variar na presença de diferentes agentes estressantes (MARTINS et al., 2002), tais como os manejos de produção, doenças, alterações ambientais e desafios, podendo indicar a condição fisiológica do peixe quando em determinada condição ambiental. Estas avaliações podem, da mesma forma, ser úteis para monitorar a saúde dos peixes (CLAUSS et al., 2008). Como as alterações hematológicas provocadas por estressores já estão bem documentadas em peixes, a hematologia tornou-se uma ferramenta útil no diagnóstico de perturbações homeostáticas (DE PAIVA et al., 2013).



### 3.2. Estresse e imunidade

Durante a fase inicial de resposta ao estresse, respostas agudas em peixes podem estimular respostas imunológicas e aumentar a imunidade inata, que está relacionada à liberação de catecolaminas (CHADZINSKA ET AL., 2012), enquanto que, condições de estresse mais prolongadas (estresse crônico) pode impor uma sobrecarga aos peixes, o que compromete sua função imunológica e reduz a imunocompetência (DHABHAR, 2000; FAST ET AL., 2008). A fase de ativação do sistema imunológico está relacionada à rápida produção de proteínas de fase aguda e à liberação de citocinas, hormônios e peptídeos (URBINATI ET AL., 2020). Já os efeitos imunossupressores do estresse são principalmente associados à ação de corticosteroides do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (URBINATI ET AL., 2020). Altos níveis de cortisol e catecolaminas circulante estão associados à imunossupressão em peixes, que afetam o metabolismo e vários processos celulares, incluindo a imunidade (TORT, 2011). A atividade da lisozima, PPT, atividade respiratórias dos leucócitos e a contagem total e diferencial de células são alguns dos parâmetros imunes inatos importantes e muitas vezes têm sido usados como indicadores de resposta ao estresse aquático, resistência a doenças e para avaliar o efeito de substâncias imunomoduladoras em peixes cultivados (KIRON, 2012; NEWAJ-FYZUL & AUSTIN, 2015, VAN HAI, 2015, Sitija-Bobadilla, & Oidtmann, 2017).

O nível ou atividade da lisozima é um índice importante da imunidade inata, amplamente utilizada como um indicador imunológico humoral em peixes (JIN ET AL., 2013; LI ET AL., 2012; YUNIS-AGUINAGA ET AL., 2016). Está bem documentado que a lisozima no peixe possui atividade lítica contra bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas, tem atividade opsônica, ativa o sistema complemento e os fagócitos, está presente no muco, tecido linfóide, plasma e outros fluidos corporais de peixes (SAURABH & SAHOO, 2008). Um parâmetro complementar importante da imunidade é a proteína plasmática total (PPT), um aumento em PPT indica melhor imunidade, pois a lisozima e os fatores complementares representam uma fração da proteína plasmática total (HABIG ET AL., 1974).

Um dos mecanismos mais importantes de defesa dos peixes é a fagocitose e algumas células são capazes de destruir partículas invasoras além

de processá-las e introduzi-las nas células específicas que irão promover a produção de imunoglobulinas (Neumann et al., 2000b). Monócitos, macrófagos e neutrófilos são fagócitos profissionais; no entanto, outras células podem realizar a fagocitose, de modo que a célula requer a detecção da partícula estranha por meio de receptores de membrana. As citocinas, sinais moleculares da inflamação, são liberadas por esses fagócitos no local da inflamação pelo tecido lesado de modo a promover quimiotaxia e mobilização dos fagócitos (STUART & EZEKOWITZ, 2005; MATHIAS et al., 2009). Os fagócitos são cruciais na defesa do peixe contra microorganismos invasores através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a medição da produção de ROS pelos fagócitos é de fundamental importância para investigar as consequências fisiológicas resultantes dos mecanismos celulares que levam ao burst oxidativo (Abreu et al., 2009, Biller-Takahashi et al., 2013).

### **3.3. Sistema oxidativo / antioxidante**

O sistema imunológico inato dos peixes apresenta mecanismos de defesa mediados por células e fatores humorais (SECOMBES & WANG 2012), sendo ambos processos demandantes de energia, impondo uma sobrecarga metabólica nos mecanismos de produção de energia celular, bem como nas respostas gerais ao estresse (MOMMSEN et al. 1999), que pode afetar o equilíbrio redox celular, causando dano oxidativo (DE FARIA et al., 2021). O estresse oxidativo nos sistemas biológicos, quando não reparados ou evitados, alteram a funcionalidade das células, tecidos e órgãos, e podem culminar em danos irreversíveis, podendo levar o organismo à morte (SALVI et al., 2001; VALAVANIDIS, 2006).

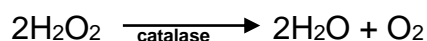
A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) é principalmente um subproduto da respiração mitocondrial que suporta processos metabólicos básicos. No entanto, quando a produção de ROS excede os mecanismos antioxidantes naturais, pode causar danos oxidativos a moléculas como carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (NIMSE E PAL 2015, DE FARIA et al., 2021). Os efeitos nos processos de infecção podem ter tanto aspectos benéficos como patológicos, dependendo da quantidade e lugar de produção. O aumento da produção de ROS após a administração de pro-oxidantes, que são direcionados contra o agente

infeccioso, é capaz de inibir a infecção tanto *in vitro* como *in vivo* (CARMO et al., 2018). Entretanto, as ROS podem estar também envolvidas em alterações patológicas no tecido do hospedeiro. A artemisinina, principal componente ativo de *A. annua* (JESSING et al., 2014) e seus derivados são consideradas substâncias pro-oxidantes, que induzem stress oxidativo através da criação de espécies reativas de oxigênio ou através da inibição dos sistemas antioxidantes (POSTMA et al., 1996), daí a importância de se estudar o seu potencial em proporcionar estresse oxidativo nos organismos em estudo.

O fígado é o principal órgão de desintoxicação do organismo e apresenta alta atividade enzimática. O principal sistema enzimático responsável por este processo é o citocromo P450 (CYPs), são hemoproteínas capazes de catalisar a oxidação de uma grande diversidade de moléculas orgânicas (ROCHA-E-SILVA et al., 2001). CYPs são as que apresentam maior versatilidade em termos catalíticos e são também as principais enzimas responsáveis pela desintoxicação e ativação metabólica de xenobióticos (ROCHA-E-SILVA et al., 2004). Acredita-se que qualquer molécula orgânica hidrofóbica, seja ela fármaco ou produto natural, possa ser substrato para uma ou outra enzima citocromo P450 (ROCHA-E-SILVA et al., 2001; ROCHA-E-SILVA et al., 2004). Estas enzimas desempenham, portanto, importante papel na carcinogênese química (ativação metabólica de pró-carcinógenos e desintoxicação de carcinógenos), e são determinantes também da tolerância a fármacos (Parkinson, 2001; Werck- Reichhart & Feyereisen, 2000; Mostafa et al., 1990; Guengerich, 1994). Os tipos e a quantidade de citocromo P450 variam de acordo com a espécie, o órgão, a idade, a saúde, o sexo, o estresse e a exposição a substâncias químicas (GIBSON & SKETT, 1994). O tecido hepático recebe alto aporte de sangue e é um dos primeiros órgãos a ser afetado. Assim, diversos trabalhos têm buscado avaliar os danos hepáticos relacionados ao estresse oxidativo envolvidos nestes processos (DE FARIA et al., 2021).

Parte do sistema de defesa antioxidante é composto por enzimas antioxidantes. Um conjunto de enzimas tem sido estudado em organismos animais como potenciais indicadores de defesa antioxidante contra estressores e em peixes vêm sendo utilizados como indicadores de estresse. No entanto, a relação entre as respostas gerais ao estresse, o sistema imunológico e o

sistema oxidativo celular ainda não estão claras em peixes. As evidências indicam que o cortisol tem um papel bifásico na mediação do sistema oxidativo (DE FARIA et al., 2021). A superoxidodismutase (SOD) é considerada a primeira linha de defesa enzimática contra a toxicidade do radical superóxido e encontra-se distribuída por todos os eucariotos (LEITCH et al., 2009). A sua atividade consiste na reação de dismutação do radical superóxido ( $O_2\cdot^-$ ) em  $H_2O$  e  $H_2O_2$ . A catalase (CAT) é a enzima responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio, o qual é convertido em  $O_2$  e água (VANDER DER OOST et al., 2003).



Essa remoção é importante para evitar o aparecimento do radical altamente reativo OH, que pode causar sérios danos ao DNA, enzimas e membranas (COGO et al., 2009). A glutatiónaperoxidase (GPx) é uma das enzimas chave para a manutenção do equilíbrio redox do organismo, modulam a produção de radicais livres, evitando a peroxidação lipídica e mantendo a estrutura e função das membranas celulares (NIMSE & PAL, 2015). Sendo assim, uma alta atividade desta enzima pode conferir uma proteção mais eficaz contra peróxidos gerados em condições oxidantes (PASCUAL et al., 2003). A glutatiónatransferase (GST), além de ser considerada uma enzima antioxidante, é responsável pela detoxificação e eliminação de compostos eletrofílicos. Sua estimulação envolve reações de conjugação na presença de glutatióna (JONSSON et al., 2002). Glutatióna, um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutatióna estão associados a dano oxidativo nos quais os níveis de glutatióna e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de estresse e infecções em peixes (NAKANO et al., 1992; SRIKANTH et al., 2013; DE FARIA et al., 2021).

A atividade enzimática antioxidantes é um dos mais importantes parâmetros bioquímicos afetados sob estresse (DE FARIA et al., 2021). Quando um órgão é afetado, a atividade enzimática pode ser aumentada ou pode ser inibida, e o aumento ou diminuição de seu nível pode ser suficiente

para fornecer informações do sistema de defesa antioxidante em peixes, (VALARMATHI & AZARIAH, 2003; DE FARIA et al., 2021).

### **3.4. Fitoterápicos: princípios ativos extraídos de plantas com potencial de uso na aquicultura**

O uso de antibióticos e quimioterápicos na aquicultura podem apresentar riscos para segurança alimentar e para os consumidores (HEUER et al., 2009; LOVE et al., 2011), bem como causar efeitos deletérios sobre os ecossistemas aquáticos (TAVECHIO et al., 2009). Como alternativa, as plantas medicinais vêm sendo estudadas, pois apresentam ampla atividade antiparasitária, antibacteriana e antifúngica sobre os animais e seres humanos (SILVA & FERNANDES, 2010), é uma estratégia emergente para melhorar a saúde e o sistema imunológico de peixes cultivados, o que pode ter benefícios substanciais para a indústria da aquicultura (CITARASU, 2010; HARIKRISHNAN et al., 2011; BAIRWA et al., 2012; VASEEHARAN & THAYA 2014; REVERTER et al.; 2014; HAI, 2015; BULFON et al., 2015; AWAD & AWAAD 2017). Plantas com propriedades imunoestimulantes têm propriedades capazes de estimular o sistema imune por conferirem um aumento na atividade das células fagocitárias, na produção de lisossomos e anticorpos, diminuir o estresse do manejo reduzindo, assim, as perdas causadas pelas doenças (SAKAI, 1999; CHITMANAT, 2002; GALINA et al., 2009; CITARASU, 2010; WANG et al., 2017).

É crescente o interesse na aquicultura por medicamentos à base de plantas, devido ao contínuo estresse a que os peixes estão expostos nos sistemas de produção, sendo o seu uso interessante para reduzir danos relacionados ao manejo, além de ser uma opção de medida profilática (VOLPATTI et al., 1998; WANG et al. 2017). Os produtos de origem natural podem beneficiar a aquicultura, principalmente nas fases iniciais de cultivo (produção), quando os peixes estão mais susceptíveis a doenças (PORTZ, 2006), proporcionando maior sustentabilidade para o cultivo de peixes, reduzindo os riscos ambientais, contribuindo para o controle de doenças e, conseqüentemente, evitar a mortalidade e perdas econômicas.

Algumas plantas apresentam potencial imunestimulante e eficácia comprovada na prevenção e controle de parasitoses na piscicultura e acredita-se que os extratos vegetais possam causar um desenvolvimento lento de resistência, serem direcionados a espécies-alvo, serem facilmente biodegradáveis, diminuam amplamente a emissão de resíduos e, conseqüentemente, serem inofensivos ao ambiente (CHAGAS, 2004; HAI, 2015; BULFON et al., 2015; WANG et al., 2017). Existe a possibilidade de que a toxicidade dos extratos vegetais ocorra em concentrações bastante elevadas e/ou exposição prolongada, dependendo da espécie de peixe em questão. Dessa forma, a toxicidade deve ser um parâmetro testado durante a verificação da eficácia de fitoterápicos.

A utilização de compostos bioativos de plantas pode apresentar alto índice de sucesso contra patógenos importantes na piscicultura, sendo de baixo custo e de mínimo impacto ambiental (EKANEM & BRISIBE, 2010; WU et al., 2016; LIEKE et al. 2019). Desta forma, desenvolver pesquisas de avaliação da eficácia de extrato de plantas em apoio ao desenvolvimento de tecnologias que dão suporte a produção sustentável é de extrema importância para a aquicultura.

### **3.5. *Artemisia annua***

Entre as diversas plantas pesquisadas na atualidade, a *Artemisia annua* se destaca como uma das potenciais soluções para auxiliar no controle parasitário dos animais de produção (HASHEMINIA et al., 2011). Popularmente conhecida no Brasil como Artemísia, é uma planta de origem chinesa, cultivada por determinados centros de pesquisa nacionais brasileiros, como o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp, Divisão de agrotecnologia). Em alguns países, é utilizada no tratamento, em humanos, de enfermidades como malária, hepatite, hipertensão, icterícia, inflamações e infecções fúngicas, bacterianas e virais (RUSTAIYAN & MASOUDI, 2011). Esta planta medicinal é a única fonte de artemisinina, que é recomendada pela Organização Mundial da Saúde para o tratamento da malária (WHO, 2012). A artemisinina é preparada por extração em grande escala da *Artemisia annua* (absinto doce) e derivados como artemeter, artesunato, arteeter e diidroartemisinina são

preparados semissinteticamente a partir do extrato purificado (BECKER et al., 2004). A artemisinina é uma lactona sesquiterpênica com um novo heterociclo 1,2,4-trioxano, a porção endoperóxido é uma característica essencial da artemisinina e seus derivados ativos (BECKER et al., 2004).

A artemisinina destrói as células de organismos parasitas através da geração de radicais livres à base de oxigênio altamente reativas ou intermediários eletrofílicos, por alquilação e oxidação de proteínas e lípidos de membranas do parasita, bem como a inativação de proteínas de canal (BECKER et al., 2004). Foi demonstrado que o efeito da artemisinina é mediado através da ruptura do potencial de membrana, interagindo com a cadeia de transporte de elétron na membrana mitocondrial, resultando em danos dos radicais livres e mitocôndrias disfuncionais (LI et al., 2005).

Vários trabalhos tem demonstrado a eficácia da artemisinina contra parasitas em humanos, aves e pequenos ruminantes (ALLEN 1997; BRISIBE et al. 2008). Entretanto, Ekanem & Brisibe (2010) descreveram o primeiro trabalho sobre a sua eficiência contra parasitas de peixes e afirmaram que a aplicação de artemisinina (em banhos) reduziu a carga parasitária nos peixes, sendo que, em alguns casos, foi possível eliminar completamente os parasitas.

A eficácia da suplementação alimentar de *Artemisia annua* em peixes foi confirmada por Wu et al. (2016). Estes autores mostraram que a administração oral com *A. annua* pode ser usada como uma estratégia potencial para o controle de infecção e aumentar a sobrevivência de peixes após o parasitismo por *Ichthyophthirius multifiliis*. Entretanto, os efeitos da suplementação de *A. annua* na fisiologia do estresse e sistema imune inato de peixes cultivados não são conhecidos.

A *A. annua* produz diversos metabólitos secundários, como as cumarinas, terpenos, fenólicos (flavonóides e taninos), entre outros (BRISIBE et al., 2009). As cumarinas possuem ação anti-inflamatória, anticancerígena (MANJUNATHA et al., 2011), e entre os compostos fenólicos englobam um grande grupo de compostos ativos que possuem alto potencial de atividade antioxidante (POURMORAD et al., 2006). O aumento da produção de radicais livres está associado a oxidação de proteínas, peroxidação lipídica e mutação do DNA, que contribui para o desenvolvimento de aterosclerose, câncer, diabetes, envelhecimento celular e processos inflamatórios (SILVA &

FERRARI, 2011; PEREIRA & PEREIRA, 2012). Portanto, a atividade antioxidante de compostos fenólicos faz com que reduzam os radicais livres no organismo, diminuindo as injúrias celulares (THITILERTDECHA et al., 2010).

No reino vegetal, *A. annua* se destaca por possuir um dos maiores potenciais antioxidantes conhecidos (FERREIRA et al., 2013). Logo, a sua inclusão na dieta de peixes pode proporcionar uma melhora no sistema imune do animal (ÁVAR et al., 2012). Além disso, esta planta também apresenta ação indireta, sendo capaz de melhorar o balanço nutricional de animais com deficiências alimentares, pois, possui entre 20 a 24% de proteína bruta (% de matéria seca), aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas, que em conjunto aos demais compostos da planta, proporciona melhora do sistema imunológico animal, auxiliando no combate aos parasitas (BRISIBE et al., 2008). As propriedades funcionais de suas folhas pode ajudar a satisfazer algumas das importantes exigências de nutrientes e minerais em monogástricos (ALASSANE et al., 2013), mostrando a importância de se explorar a utilização desta planta como suplemento alimentar na produção de peixes.

### **3.6. Espécies estudada: tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

A tilápia do Nilo é peixe pertencente a família Ciclidae, nativa da África, Israel e Jordânia (ABDEL-FATTAHM & EL-SAYED, 2006). Devido ao seu potencial para aquicultura, a produção desta espécie de peixe teve sua distribuição expandida para muitos países, de diferentes climas e sistemas de produção (BOSCOLO et al., 2001).

A tilápia é a segunda espécie de peixes mais cultivada no mundo, perdendo apenas para as carpas (ADEOYE et al., 2016). Na produção mundial, cerca de 4,5 milhões de toneladas são de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), representando 8,3 % da produção da aquicultura mundial (FAO, 2020). No Brasil, a tilápia do Nilo se tornou nas últimas décadas a espécie mais cultivada (MARENGONI, 2006; RODRIGUES et al., 2015), produzida em praticamente todo o território nacional, com exceção das regiões abrangidas pelas Bacias do Amazonas e Paraguai, onde seu cultivo não é permitido pela legislação ambiental vigente.

A tilápia do Nilo reúne diversas características favoráveis à produção e preferência pelos consumidores, como: carne branca, textura firme, sabor



delicado, fácil filetagem, ausência de odor desagradável e de espinha intramuscular em “Y” (SCHWARZ et al.,2010; RIGHETTI et al., 2011), aspecto fibroso e succulento (KUBTIZA, 2000) e baixo teor de gordura (KUBTIZA, 1999). Apresenta hábito alimentar onívoro (BARROS et al., 2002), podendo alimentar-se de matéria orgânica, plâncton, algas, pequenos invertebrados e plantas aquáticas, sendo considerada uma espécie oportunista, consumindo parte ou todos os alimentos disponíveis (PÁDUA, 2001). A tilápia nilótica é de grande interesse para a piscicultura, pois apresenta excelente conversão alimentar (MORAES et al., 2009), é altamente adaptável aos diversos ambientes de produção, é de fácil domesticação e reprodução (SIMÕES et al.,2007), apresenta alta fecundidade, maturidade sexual precoce e rápida taxa de crescimento (RIGHETTI et al., 2011; SILVA; AMARAL, 2013).

## 4. Referências Bibliográficas

- ABDEL-FATTAH, M.; EL-SAYED. Basic biology and ecology. In: ABDEL-FATTAH, M. & EL-SAYED Tilapia culture. Oceanography Department, Faculty of Science, Alexandria: Egypt CABI, 2006. P. 25-33.
- ABREU, J. S., MARZOCCHI-MACHADO, C. M., URBACZEK, A. C., FONSECA, L. M., & URBINATI, E. C. (2009). Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Brazilian Journal of Biology*, 69(4), 1133-1139.
- ADEYOYE, A. A.; JARAMILLO-TORRES, A.; FOX, S. W.; MERRIFIELD, D. L.; DAVIES, S. J. Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: Overall performance and effects on intestinal histology and microbiota. *Animal Feed Science and Technology* 2016.
- ALASSANE, T.; MOUHAMADOU, D.; OMAR, G. P. E. H.; AHMADOU, W.; PIERRE, L.; OUSMANE, S.; SOULEYMANE, M. Characterization of element and mineral content in *Artemisia annua* and *Camellia sinensis* leaves by handheld X-ray fluorescence. *African Journal of Biotechnology* 2013, v. 12, n. 26, p. 4179-4186.
- ALLEN, P. C.; LYDON, J.; DANFORTH, H. D. Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens. *Poultry science* 1997, v. 76, n. 8, p. 1156-1163.
- AWAD E, AWAAD (2017) A role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish Shellfish Immunol* 67:40–54
- BAIRWA MK; JAKHAR J; REDDY AD (2012) Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. *J Nat Prod Plant Resour* 2:397–400
- BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; KLEEMANN, G.K, HISANO, H.; ROSA, G. J. M. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 2002, v.31, n.6, p.2149-2156.
- BARTON B. A. Endocrine and metabolic responses of fish to stress. *Int Assoc Aquat Anim Med Proc* 1988, v.19, p.41-55.
- BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North American Journal of Aquaculture* 2000, v. 62, n. 1, p. 12-18.
- BECKER, K.; TILLEY, L.; VANNERSTROM, J. L.; ROBERTS, D.; ROGERSON, S.; GINSBURG, H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. *International journal for parasitology* 2004, v. 34, n. 2, p. 163-189.
- BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J. E. P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Scientia Agricola* 2006, v.63, n.3, p.281-284.
- BEN HAMED, S.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TACHIBANA, L.; DE C. DIAS, D.; ISHIKAWA, C.M.; ESTEBAN, M.A. Fish pathogen bacteria: adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells, *Fish Shellfish Immunol.* 80 (2018) 550–562, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.053>.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L. S., SAITA, M. V., GIMBO, R. Y., & URBINATI, E. C. (2013). Leukocytes respiratory burst activity as indicator of

- innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, 73(2), 425-429.
- BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*, linhagens tailandesa e comum, nas fases iniciais e de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001, v. 30, n. 5, p. 1391-1396.
- BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A.; NEU, D. H.; DIETERICH, F. Sistema orgânico de produção de pescado de água doce. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 2012, v. 13 n. 2.
- BRANDÃO, F. R.; DE CARVALHO GOMES, L.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazônica* v. 36, n. 3, p. 349-356, 2006.
- BRISIBE, E. A.; UMOREN, U. E.; BRISIBE, F.; MAGALHÃES, P. M.; FERREIRA, J. F.; LUTHRIA, D.; PRIOR, R. L. Nutritional characterization and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. *Food chemistry* 2009, v. 115, n. 4, p. 1240-1246.
- BRISIBE, E. A.; UMOREN, U. E.; OWAI, P. U.; BRISIBE, F. Dietary inclusion of dried *Artemisia annua* leaves for management of coccidiosis and growth enhancement in chickens. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 22, 2008.
- BULFON C; VOLPATTI D; GALEOTTI M (2015) Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquac Res* 46: 513–551
- CASEWELL, M.; FRIIS, C.; MARCO, E.; MCMULLIN, P.; PHILLIPS, I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother*, v. 52, p. 159–161, 2003.
- ČAVAR, S.; MAKSIMOVIĆ, M.; VIDIC, D.; PARIĆ, A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products* 2012, v. 37, n. 1, p. 479-485.
- CHADZINSKA, M., TERTIL, E., KEPKA, M., HERMSEN, T., SCHEER, M., VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.L., 2012. Adrenergic regulation of the innate immune response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 36, 306–316.
- CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2004, v. 13, n. 1, p. 156-160.
- CHITMANAT, C. 2002 Fish Immunostimulants. *Songklanakarin Journal Science and Technoogy* 2002, v. 24, n. 4, p. 739-747.
- CITARASU G (2010) Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquac Int* 18:403–414
- CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D.; ARNOLD, J. E. Hematologic disorders of fish. *Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice* 2008, v. 11, n.3, p. 445-462.
- COGO, A. J.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza online* 2009, v. 7, n. 1, p. 37-42.
- CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y., BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K. A piscicultura e o ambiente - O uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2010, v. 39, n. supl. especial, p. 68-87.

- DE FARIA, C. D. F. P., DOS REIS MARTINEZ, C. B., TAKAHASHI, L. S., DE MELLO, M. M. M., MARTINS, T. P., & URBINATI, E. C. (2021). Modulation of the innate immune response, antioxidant system and oxidative stress during acute and chronic stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 1-11.
- DE PAIVA, M. J. T. R.; DE PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. *Métodos para análise hematológica em peixes*. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, 2013.
- DHABHAR, F.S., 2000. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity - the role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917, 876–893.
- Divisão de agrotecnologia. Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Disponível em: <https://www.cpqba.unicamp.br/divisooes/agrotecnologia/dagro-a-divisao.html> Acesso em: 03 de jun. de 2021.
- DO CARMO, M. A. V.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Polyphenols as potential antiproliferative agents: Scientific trends. *Current Opinion in Food Science*, v. 24, p. 26-35, 2018.
- EKANEM, A. P.; BRISIBE, E. A. Effects of ethanol extract of *Artemisia annua* L. against monogenean parasites of *Heterobranchus longifilis*. *Parasitology research* 2010, v. 106, n. 5, p. 1135-1139.
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAST, M.D., HOSOYA, S., JOHNSON, S.C., AFONSO, L.O.B., 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 194–204.
- FERREIRA, J. F. S.; ZHELJAZKOV, V. D.; GONZALEZ, J. M. Artemisinin concentration and antioxidant capacity of *Artemisia annua* distillation by product. *Industrial Crops and Products* 2013, v. 41, p. 294-298.
- GALINA J; YIN G; ARDÓ L; JENEY Z (2009) The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiol Biochem* 35:669–676
- GIBSON, G. & SKETT, P., 1994. Introduction to drug metabolism, 2nd edition, New York, Blackie Academic & Professional Publishers
- GUENGERICH, F. P., 1994. Catalytic selectivity of human cytochrome P450 enzymes: Relevance to drug metabolism and toxicity. *Toxicology Letters*, 70: 133 – 138.
- HABIG, W.; PABST, M.; JAKOBY, W. Glutathione S-transferases, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7130–7139.
- HAI NV (2015) The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. *Aquaculture* 446:88–96
- HARIKRISHNAN R; BALASUNDARAM C; HEO M-S (2011) Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317:1–15
- HASHEMINIA, S. M.; SENDI, J. J.; JAHROMI, K. T.; MOHARRAMIPOUR, S. The effects of *Artemisia annua* and *Achillea millefolium* crude leaf extracts on the toxicity, development, feeding efficiency and chemical activities of small cabbage *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Pesticide biochemistry and physiology* 2011, v. 99, n. 3, p. 244-249.

- HE, S.; WANG, Q.; LI, S.; RAN, C.; GUO, X.; ZHANG, Z.; ZHOU, Z. Antibiotic growth promoter olaquinox increases pathogen susceptibility in fish by inducing gut microbiota dysbiosis. *Science China Life Sciences*, v. 60, n. 11, p. 1260-1270, 2017.
- HEUER, O. E.; KRUSE, H.; GRAVE, K.; COLLIGNON, P.; KARUNASAGAR, I.; ANGULO, F. J. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases* 2009, v. 49, n. 8, p. 1248-1253.
- HOUSTON, A. H. Review: are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? *Transactions of the American Fisheries Society* 1997, v. 126, n. 6, p. 879-894.
- IWAMA, G. K. Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998, v. 851, n.1, p. 304-310.
- JESSING, K. K.; DUKE, S. O.; CEDERGREEN, N. (2014). Potential ecological roles of artemisinin produced by *artemisia annua* L. *Journal of Chemical Ecology*, 40(2), 100–117. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0384-6>
- JIN, Y., TIAN, L., ZENG, S., XIE, S., YANG, H., LIANG, G., LIU, Y. (2013). Dietary lipid requirement on non-specific immune responses in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1202–8. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.008>
- JONSSON, C. M.; FERRACINI, V. L.; PARAIBA, L. C.; RANGEL, M.; AGUIAR, S. R. Alterações bioquímicas e acúmulo em pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. *Scientia Agricola* 2002, v. 59, n.3, p. 441-446.
- KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care, *Anim. Feed Sci. Technol.* 173 (2012) 111–133, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015>.
- KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: KUBITZA, F., 2000. p. 285.
- KUBTIZA, F. Tanques-rede, rações e impacto ambiental. *Panorama da Aqüicultura* 1999, v. 9, n. 51, p. 44-50.
- LEITCH, J. M.; YICK, P. J.; CULOTTA, V. C. The right to choose: multiple pathways for activating copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 2009, v. 284, n. 37, p. 24679-24683.
- LI, W.; MO, W.; SHEN, D.; SUN, L.; WANG, J.; LU, S.; ZHOU, B. Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in the action of artemisinin. *Plos Genet* 2005, v. 1, n. 3, p. 36.
- LI, X.F., LIU, W. B., LU, K. L., XU, W.N., WANG, Y. (2012). Dietary carbohydrate/lipid ratios affect stress, oxidative status and non-specific immune responses of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Fish Shellfish Immunol*, 33,2, 316–323. Doi:10.1016/j.fsi.2012.05.007
- LIEKE T; MEINELT T; HOSEINIFAR SH; PAN B; STRAUS DL; STEINBERG CEW (2019) Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Rev Aquac*:1–23
- LOPES, R. B.; CECARELLI, P. S.; TORNISIELO, V. L. Insumos químicos na piscicultura paulista. *Panorama da Aqüicultura* 2005, vol. 15, n. 89, p. 29-31.
- LOVE, D. C.; RODMAN, S.; NEFF, R. A.; NACHMAN, K. E. Veterinary drug residues in seafood inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009. *Environmental science e technology* 2011, v. 45, n. 17, p. 7232-7240.

- MANJUNATHA, M.; NAIK, V. H.; KULKARNI, A. D.; PATIL, S. A. DNA cleavage, antimicrobial, anti-inflammatory anthelmintic activities, and spectroscopic studies of Co (II), Ni (II), and Cu (II) complexes of biologically potential coumarin Schiff bases. *Journal of Coordination Chemistry* 2011, v. 64, n. 24, p. 4264-4275.
- MARENGONI, N.G. Produção de Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Linhagem Chitralada), Cultivada em Tanques-Rede, Sob diferentes densidades de Estocagem. *Arch. Zootec* 2006, v. 55, n. 210, p. 127-138.
- MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; NOMURA, D. T.; FENERICK, JR. J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples e consecutivos de captura. *Boletim do Instituto de Pesca* 2002, v. 28, p. 195-204.
- MATHIAS, JR., DODD, ME., WALTERS, KB., YOO, SK., RANHEIM, EA., HUTTENLOCHER, A., 2009. Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 33, no. 11, p. 1212-1217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2009.07.003>
- MEISTER, Alton; ANDERSON, Mary E. Glutathione. *Annual review of biochemistry*, v. 52, n. 1, p. 711-760, 1983.
- MENTEN, J. F. M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Piracicaba: SBZ. v. 38. p. 151-157. 2001.
- MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fish* 9:211–268. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>
- MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 1999; v. 9, p. 211-268.
- MORAES, A. M.; SEIFFERT, W. Q.; TAVARES, F.; FRACALOSSO, D. M. Desempenho zootécnico de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, com diferentes rações comerciais. *Revista Ciência Agrônômica* 2009, v. 40, n. 03, p. 388-395.
- MOSTAFA, M. H., SHEWEITA, S. A., & ABDEL-MONEAM, N., 1990. Influence of some anti-inflammatory drugs on the activity of aryl hydrocarbon hydroxylase and cytochrome P-450 content. *Environmental Research*, 52: 77 – 82
- MOTA, R. A.; DA SILVA, K. P. C.; DE FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; DA SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multiresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2005, v. 42, n. 6, p. 465-470.
- MURTY, A. S. *Toxicity of pesticides to fish. Chapter 3*. v.1, CRC Press, Boca Raton. 1986, p. 69-115.
- NAKANO, T.; SATO, M.; TAKEUCHI, M. Glutathione peroxidase of fish. *Journal of food science*, v. 57, n. 5, p. 1116-1119, 1992.
- NEWAJ-FYZUL, A.; AUSTIN, B. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases, *J. Fish. Dis.* 38 (2015) 937–955, <https://doi.org/10.1111/jfd.12313>.
- NIMSE, S. B.; PAL, D. (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances* 5:27986–28006

- PÁDUA, D. M. C. A frequência alimentar e a utilização dos nutrientes pela Tilápia do Nilo. 2001. 103p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.
- PARKINSON, A., 2001. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, (C. D., KLAASSEN, org), pp. 113 – 186, 9th edition, New York, McGraw\_Hill, Inc.
- PASCUAL, P.; PEDRAJAS, J. R.; TORIBIO, F.; LÓPEZ-BAREA, J.; PEINADO, J. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparusa urata*). *Chemico-biological interactions* 2003, v. 145, n. 2, p. 191-199.
- PEREIRA, B. C.; PEREIRA, A. K. T. Radicais livres: Uma nova abordagem. *Revista Saúde Quântica* 2012, v. 1, n. 1, p. 35-42.
- POSTMA, N. S.; ZUIDEMA, J.; MOMMERS, E. C.; ELING, W. M. C. Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy. *Pharmacy World and Science* 1996, v. 18, n. 4, p. 121-129.
- POURMORAD, F.; HOSSEINIMEHR, S. J.; SHAHABIMAJD, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African journal of biotechnology* 2006, v. 5, n. 11.
- RAHMAN, B.M.H.; SUZUKI, S.; KAWAI, K. The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*, J. Appl. Ichthyol. 17 (2001) 282–285.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, E. A. T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. S.; LIZAMA, M. A. P. (Ed.). *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Editora Varela, 2004. cap. 4, p. 89-120.
- REDA, R. M.; IBRAHIM, R. E.; AHMED, E. N. G.; EL-BOUHY, Z. M. Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 39, n. 4, p. 241-248, 2013.
- REVERTER M; BONTEMPS N; LECCHINI D; BANAIGS B; SASAL P (2014) Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture* 433:50–61
- RIGHETTI, J. S.; FURUYA, W. M.; CONEJERO, C. I.; GRACIANO, T. S.; VIDAL, L. V. O.; MICHELLATO, M. Redução da proteína em dietas para tilápias-do-Nilo por meio da suplementação de aminoácidos com base no conceito de proteína ideal. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2011, v. 40, n. 3, p. 469-476.
- RIGHETTI, J. S.; FURUYA, W. M.; CONEJERO, C. I.; GRACIANO, T. S.; VIDAL, L. V. O.; MICHELLATO, M. Redução da proteína em dietas para tilápias-do-Nilo por meio da suplementação de aminoácidos com base no conceito de proteína ideal. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2011, v. 40, n. 3, p. 469-476.
- RINGO, E.; OLSEN, R. E.; GIFSTAD, T. O.; DALMO, R. A.; AMLUND, H., HEMRE, G. I.; BAKKE, A. M. Probiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 2010, v. 16, n. 2, p. 117-136.
- ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R.; TRANT, J. M. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *The Progressive Fish-Culturist* 1987, v. 49, n. 1, p. 1-12.
- ROCHA-E-SILVA, T. A., FARLEY, B., NONAKA, K. O., SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S., RANTIN, F. T., & DEGTEREV, I. A. (2001). Spectral

- characteristics of a compound altering cytochrome P450 spectra from vertebrate microsomes suggest that it is a functional protein. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(1), 53-66.
- ROCHA-E-SILVA, T. A.; RANTIN, F. T.; MATSUMURA-TUNDISI, J. E.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G.; & DEGTEREV, I. A. (2004). Dynamics of cytochrome P450 inducers in polluted sites of Sao Paulo city reservoirs. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59(1), 109-115.
- RODRIGUES, R. L.; BORGES, I. B.; GOMES, V. A. P.; RIBEIRO, G. M.; FREITAS, R. R. Caracterização e análise da gestão produtiva e comercialização em um cultivo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede no norte do Espírito Santo, Brasil. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources* 2015, v. 3, n. 1, p. 109-127.
- RUSTAIYAN, A.; MASOUDI, S. Chemical constituents and biological activities of Iranian Artemisia species. *Phytochemistry Letters* 2011, v. 4, n. 4, p. 440-447.
- SAKAI, M. Current status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 1999, v. 172, p. 63-92.
- SALVI, A.; CARRUPT, P. A.; TILLEMENT, J. P.; TESTA, B. Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochemical Pharmacology* 2001, v. 61, n. 10, p. 1237-1242.
- SAURABH, Shailesh; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture research*, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.
- SCHWARZ, K. K.; FURUYA, W. M.; NATALI, M. R. M.; MICHELATO, M.; GUALDEZI, M. C. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias-do-Nilo. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 2010, v. 32, n. 2, p. 197-203.
- SECOMBES, C.J.; WANG, T. (2012) The innate and adaptive immune system of fish. In: Austin B (ed) *Infectious disease in aquaculture: prevention and control*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pp 3–68
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine* 1991, v. 91, n. 3, p. 31-38.
- SILVA, L. E. S.; AMARAL, C. M. C. Produção intensiva de tilápias em tanques-rede. *Enciclopédia Biosfera* 2013, v.9, n.17, p. 21-50.
- SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of the antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2010 v. 16, n. 3, p. 402-413.
- SILVA, W. J. M. D.; FERRARI, C. K. B. Mitochondrial metabolism, free radicals and aging. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia* 2011, v. 14, n. 3, p. 441-451.
- SIMÕES, M. R.; RIBEIRO, C. F. A.; RIBEIRO, S. C. A.; PARK, K. J.; MURR, F. E. X. Composição Físico-Química, Microbiológica e Rendimento do Filé de Tilápia Tailandesa (*Oreochromis niloticus*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2007, v. 27, p. 608-613.
- SITJÀ-BOBADILLA, A.; OIDTMANN, B. Integrated pathogen management strategies in fish farming. In: *Fish diseases*. Academic Press, 2017. p. 119-144.



- SITJJA-BOBADILLA, A.; OIDTMANN, B. Integrated pathogen management strategies in fish farming, in: A. Press (Ed.), *Fish Dis.*, 2017, pp. 119–144, accessed, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128045640000053>. (Accessed 13 August 2020).
- SPACIE, A.; HAMELINK, J.L. Bioaccumulation. In: RAND, G.M. and PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington. 1985, p. 495-525.
- SRIKANTH, K.; PEREIRA, E.; DUARTE, A. C.; AHMAD, I. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 20, n. 4, p. 2133-2149, 2013.
- STUART, LM. and EZEKOWITZ, RAB., 2005. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*, vol. 22, no. 5, p. 539-550. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2005.05.002>
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. D.; MARTINS, M. L.; SANTANA, A. E. (2002). Haematological changes in *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. *Bol Inst Pesca* 2002, v. 28, n. 1, p. 1-9.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Hematologia de Peixes Teleósteos. Ribeirão Preto: Marcos Tavares-Dias, 2003. 144p.
- TAVECHIO, W.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. *Boletim do Inst. Pesca* 2009, v. 35, n. 2, p. 335-41.
- THITILERTDECHA, N.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D.; RAKARIYATHAM, N. Identification of major phenolic compounds from *Nephelium lappaceum* L. and their antioxidant activities. *Molecules* 2010, v. 15, n. 3, p. 1453-1465.
- TORT L (2011) Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol* 35:1366–1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
- URBINATI, Elisabeth Criscuolo; ZANUZZO, Fábio Sabbadin; BILLER, Jaqueline Dalbello. Stress and immune system in fish. In: *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Academic Press, 2020. p. 93-114.
- VALARMATHI, S.; AZARIAH, J. (2003). Effect of copper chloride on the enzyme activities of the crab *Sesarma quadratum* (Fabricius). *Turkish Journal of Zoology* 2003, v. 27, n. 3, p. 253-256.
- VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety* 2006, v. 64, n. 2, p. 178-189.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology* 2003, v. 13, n. 2, p. 57-149.
- VAN HAI, N. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review, *Aquaculture* 446 (2015) 88–96, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.014>.

- VASEEHARAN B; THAYA R (2014) Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquac Int* 22:1079–1091
- VOLPATTI, D.; D'ANGELO, L.; JENEY, G.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P.; GALEOTTI, M. Nonspecific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. *Journal of Applied Ichthyology* 1998, v. 14, n. 34, p. 201-206.
- WANG W; SUN J; LIU C; XUE Z (2017) Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquac Res* 48:1–23
- WEDEMEYER G. A. Physiology of fish in intensive culture systems. New York: Chapman & Hall, 1996.
- WEDEMEYER G. A; BARTON B.; MC LEAY D. Stress and acclimation. In: Schreck C, Moyle P. (Ed.). *Methods for fish biology*. Bethesda, MD: American Fisheries Society, 1990. p. 451-489.
- WEDEMEYER, G. A.; McLEAY, D. J. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: PICKERING, A. D. (Ed.). *Stress and fish*. London: Academic, 1981. p. 247-275.
- WENDEELAR BONGA S. E. The stress response in fish. *Physiol Rev* 1997, v.77, p.591-625.
- WERCK-REICHART, D. & FEYREISEN, R., 2000. Cytochromes P450: uma história de sucesso. *Genome Biology*, 1 (6): 1 – 9.
- WHO, Effectiveness of Non-Pharmaceutical Forms of *Artemisia annua* L. against malaria, World Heal. Organ. Geneva (2012) (June 2012)
- WU, Z.; LING, F.; SONG, C.; CHEN, W.; WANG, G. Effects of oral administration of whole plants of *Artemisia annua* on *Ichthyophthirius multifiliis* and *Aeromonas hydrophila* after parasitism by *I. multifiliis*. *Parasitology Research* 2016, v. 116, n. 1, p. 91-97.
- YADA, Takashi; TORT, Lluís. Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions. In: *Fish physiology*. Academic Press, 2016. p. 365-403.
- YIN, G.J., ARDO, L., THOMPSON, K.D., ADAMS, A., JENEY, Z., JENEY, G., 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 140–145.
- YOUSEFIAN, M.; AMIRI, M. S. The review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African Journal of Biotechnology* 2009, v. 8, n. 25, p. 7313-7318.
- YUNIS-AGUINAGA, J., FERNANDES, D.C., ETO, S.F., CLAUDIANO, G.S., MARCUSSO, P.F., MARINHO-NETO, F.A., FERNANDES, J.B.K., DE MORAES, F.R., DE MORAES, J.R.E. (2016). Dietary camu camu, *Myrciaria dubia*, enhances immunological response in Nile tilapia. *Fish Shellfish Immunol*, 58, 284–291. Doi:10.1016/j.fsi.2016.08.030
- ZANUZZO, F.S., BILLER-TAKAHASHI, J.D., URBINATI, E.C., 2012. Effect of Aloe vera extract on the improvement of the respiratory activity of leukocytes of matrinxa during the transport stress. *Braz. J. Anim. Sci.* 41, 2299–2302.
- ZANUZZO, F.S., SABIONI, R.E., MONTOYA, L.N.F., FAVERO, G., URBINATI, E.C., 2017. Aloe vera enhances the innate immune response of pacu

(*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. Fish Shellfish Immunol. 65, 198–205.



## Resumo

Patógenos bacterianos causam perdas econômicas significativas em fazendas de peixes em todo o mundo. O uso frequente de antibióticos é uma preocupação crescente devido aos efeitos adversos na saúde humana e no meio ambiente. Avaliamos a atividade antibacteriana da *Artemisia annua* e seus componentes bioativos contra *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare*, as principais bactérias que afetam a piscicultura. Os componentes bioativos da *A. annua* foram obtidos pelo processo de extração alcoólica, rendendo 10,6% de matéria seca. O extrato alcoólico dos compostos bioativos de *A. annua* (ae-Aa) foi fracionado, obtendo-se as frações F1 + 2, F3, F4, F5 e F6. A artemisinina em até 10,0 mg.ml<sup>-1</sup> foi ineficaz no controle das bactérias estudadas. Os microrganismos testados foram todos sensíveis a ae-Aa (MIC e MBC 0,40 a 2,50 mg.ml<sup>-1</sup>). Os componentes ae-Aa F3, F4, F5 e F6 também foram eficazes (MIC e MBC 0,015 a 2,00 mg.ml<sup>-1</sup>). F3 mostrou a atividade antibacteriana mais eficaz (MIC 0,015 a 0,5 mg.ml<sup>-1</sup> e MBC 0,015 a 2,0 mg.ml<sup>-1</sup>). O ae-Aa e seus componentes bioativos apresentam eficácia para inibir o crescimento e eliminar bactérias patogênicas e podem ser uma alternativa aos antibióticos sintéticos para peixes cultivados.

**Palavras-chave:** Extrato alcoólico; Artemisinina; MIC; MBC; Bactérias patogênicas de peixes

## 1. Introdução

Os patógenos bacterianos estão entre as doenças emergentes e são uma grande ameaça à produção de peixes (Hamed et al., 2018). As bactérias que causam doenças graves na produção de peixes de água doce em todo o mundo incluem *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp. (Lio-Po & Lim, 2014). Os prejuízos econômicos causados por essas bactérias podem chegar a 15% ou 20% da produção total (Tavares-Dias & Martins, 2017).

Antibióticos são usados para prevenir e tratar doenças bacterianas na piscicultura (Romero, Feijoó, & Navarrete, 2012) e seus resíduos representam desafios devido aos seus significativos efeitos adversos de longo prazo. Alternativamente, as plantas são uma fonte potencial de agentes antimicrobianos para uso na aquicultura. Estudos demonstraram que a artemisinina e outros compostos bioativos isolados da *Artemisia annua* têm atividades farmacológicas únicas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, cepas de fungos e patógenos (Appalasamy et al., 2014; Kim et al., 2015). No entanto, o uso potencial de *Artemisia annua* e seus compostos bioativos, como artemisinina ou frações para tratar as principais doenças bacterianas na produção de peixes é desconhecido. Portanto, é fundamental identificar os componentes bioativos do *A. annua* que podem atuar contra as bactérias dos peixes e estabelecer métodos para otimizar seu uso. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar se a artemisinina comercial, o extrato alcoólico de *A. annua* e seus componentes bioativos possuem ação antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e

*Flavobacterium columnare*, as principais bactérias que afetam os peixes em produção.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Extrato alcoólico de A. annua (ae-Aa) e fracionamento*

Folhas de *A. annua* foram coletadas no campo experimental do Centro de Pesquisas em Química, Biologia e Agricultura, Paulínia, SP, Brasil; seco por 96 horas em estufa de circulação de ar com aquecimento a gás (40 ° C) e pulverizado em moinho de facas (MR 030). O material de folha em pó seco (2.027,96 g) e o etanol foram misturados com ultra-turrax (T50 basic IKA-werke) a 8.000 rpm por 5 min em temperatura ambiente e separados por filtração a vácuo. A extração foi repetida dez vezes (33,5 litros em etanol total) e os extratos foram combinados e evaporados em evaporador rotativo (Fisaton 802) a 45 ° C. O extrato de álcool foi adicionado com Polivinilpirrolidona (PVP; Synth) a 1:4 e dissolvido em álcool etílico p.a. (99,8%), e seco novamente em um evaporador rotativo sob vácuo, resultando em 1.061 g de pó de ae-Aa.

O fracionamento foi realizado em coluna de sílica (100 g, Merck®; 1,7 cm de diâmetro interno e 60 cm de altura) em coluna de cromatografia a seco com suporte de acetato de celulose. O ae-Aa (1,5045 g) foi combinado com 3,008 g de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm), seco em um evaporador rotativo sob vácuo por 24 h e introduzido no topo da coluna. A fase móvel foi o solvente clorofórmio:metanol (95: 5), onde foram obtidas seis frações. As duas primeiras frações foram combinadas como fração 1 (F1+2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5) e fração 6 (F6). Cada fração foi combinada com PVP na proporção de 1:4 e dissolvida em álcool etílico PA, e seca novamente.

## 2.2. Análise

A análise por HPLC para quantificação da artemisinina nos extratos foi realizada em um cromatógrafo líquido Waters (Massachusetts, EUA), bomba Waters 515, acoplado a um detector de índice de refração Waters 2414; temperatura interna do detector 35 °C; temperatura da coluna 35 °C. Válvula de injeção Rheodyne com um loop de amostragem de 20 µL. Os dados de cromatografia foram analisados usando o software Empower-Waters. Foi usada a coluna Cyano, Luna CN-5 (250x4,6 mm, 5 µm - Phenomenex, Califórnia, EUA); fase móvel água: metanol (65:35 v / v); modo isocrático e taxa de fluxo 1,0 ml min<sup>-1</sup>.

Para extração em fase sólida, cartuchos de Florisil (Strata 8B-SO13-HCH, Phenomenex, Califórnia, EUA) foram conectados ao sistema de extração a vácuo e acondicionados com 10 ml de hexano. O extrato foi dissolvido em 2 ml de diclorometano e introduzido no cartucho, eluido com 3 ml de hexano e 40 ml de diclorometano. A fração de diclorometano foi seca em um evaporador rotativo e ressuspensa com metanol de grau de HPLC em um balão volumétrico de 5 ml. As amostras foram filtradas (membranas Durapore PVDF de 0,45 µm, Millipore) e analisadas por HPLC / IR.

A análise GC-MS para identificar os compostos no extrato e nas frações foi realizada em um detector seletivo de massa/cromatografia gasosa HP-6890/HP-5975, equipado com coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm). As temperaturas de operação foram: injetor: 250 °C; detector: 300 °C e forno de coluna: 110 °C, 5 °C · min<sup>-1</sup> até 280 °C (26 min). Hélio de grau cromatográfico (1,0 ml·min<sup>-1</sup>) foi o gás transportador.



### 2.3. Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC)

As atividades antibacterianas de artemisinina comercial (Sigma-Aldrich, EUA), ae-Aa e compostos bioativos de ae-Aa foram avaliadas contra *Aeromonas hydrophila* (ATTC7966 e isolado clínico), *Streptococcus agalactiae* (ATCC13813 e isolado clínico) e *Flavobacterium columnare* (isolado clínico). O efeito antibacteriano foi avaliado pelo método de micro diluição em caldo (Vaz et al., 2012). O inóculo para os ensaios foi preparado diluindo uma massa celular em uma solução de NaCl a 0,85% e ajustando à escala de McFarland de 0,5 suspensões de células. Os testes de MIC foram realizados de acordo com (CLSI, 2005) usando caldo Muller-Hinton em uma placa de teste de cultura de tecidos (96 poços). As soluções estoques do ae-Aa, frações e artemisinina foram diluídas para obtenção de concentrações na faixa de 0,020-10 mg ml<sup>-1</sup>. O cloranfenicol (Merck) foi utilizado como controle positivo. As medidas de concentração foram realizadas em triplicata para cada microrganismo. A atividade antibacteriana foi detectada pela adição de 20 µL de uma solução aquosa de 0,5% de TTC (cloreto de trifeniltetrazólio, Merck). MIC foi definido como a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento visível, conforme indicado pela coloração TTC (Majolo et al., 2017).

Alíquotas de 10 µL dos poços MIC foram colocadas na superfície do meio Agar Nutrient, por espalhamento. Para a bactéria *S. agalactiae*, foi adicionado ao meio 0,5% de cisteína. O MBC foi definido como a menor concentração capaz de conferir a morte de 100% das bactérias, das quais nenhum crescimento foi detectado.

### 3. Resultados

O rendimento do ae-Aa das folhas secas de *A. annua* foi de 10,6%. No fracionamento de ae-Aa, F3 foi a maior concentração da fração obtida (55% do total; Tabela 1). De acordo com a análise de HPLC, o teor de artemisinina no ae-Aa era de 1,8%. A avaliação da composição química por GC-MS (Tabela 2) revelou que os principais constituintes do ae-Aa são a artemisinina (15,21%) e a deoxy-artemisinina (12,85%). Esses mesmos constituintes estão concentrados em F3, com 19,87% e 17,00%, respectivamente. O material suplementar contém detalhes dos cromatogramas obtidos por GC-MS do extrato alcoólico de *Artemisia annua* (Fig. S1 A), F3 (Fig. S1 B), espectros de massa de artemisinina presente no extrato alcoólico de *Artemisia annua* (Fig. S2 A), artemisinina padrão (Fig. S2 B) e desoxi-artemisinina (Fig. S2 C).

As concentrações testadas da artemisinina comercial e F1+2 foram ineficazes no controle ou inibição do crescimento *in vitro* das três bactérias testadas (Tabela 3). As frações 3 a 6 do ae-Aa foram eficazes contra todas as bactérias testadas com valores de MIC variando de 0,015 a 2 mg.ml<sup>-1</sup> e MBC variando de 0,015 a 2 mg.ml<sup>-1</sup> (Tabela 3). O antibacteriano mais eficaz foi a fração F3 do ae-Aa (MIC = 0,015 a 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>; MBC = 0,015 a 2 mg.ml<sup>-1</sup>).

### 4. Discussão

O ae-Aa apresentou potencial eficácia *in vitro* para inibir o crescimento e eliminar *A. hydrophila*, *F. columnare* e *S. agalactiae* e pode ser usado para tratar infecções bacterianas em peixes. Por outro lado, a artemisinina comercial, principal componente ativo de *A. annua* (Jessing, Duke, & Cedergreen, 2014), não apresentou inibição *in vitro* sobre o crescimento e

efeito bactericida contra as bactérias estudadas. Slade et al. (2009) também não relatou o efeito bactericida da artemisinina, corroborando nossos dados. Por outro lado, a artemisinina a  $0,09 \text{ mg.mL}^{-1}$  apresentou efeito antibacteriano sobre cepas de *Salmonella* spp. (Appalasamy et al., 2014), e a  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  em *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris* (Dhingra, Pakki, & Narasu., 2000). Variações na eficácia da artemisinina podem ser devido a diferentes métodos de extração, composição e pureza dos compostos testados (Thøfner et al., 2012). No entanto, deve-se ressaltar que a inclusão de maiores concentrações de artemisinina na alimentação de peixes deve ser inviável devido ao seu alto custo.

O estudo de novas substâncias com potencial para tratar infecções bacterianas na produção animal é relevante e pode reduzir os custos de produção e o impacto ambiental causado pelo uso de antibióticos. Porém, é fundamental identificar os componentes bioativos das substâncias que podem atuar contra as bactérias e estabelecer métodos para otimizar seu uso. O ae-Aa, devido à eficácia antibacteriana in vitro, tornou-se um potencial composto bioativo de *A. annua* para ser utilizado na produção de peixes. Estudos avaliando a MIC de plantas medicinais mostram que os extratos etanólico apresentam maior atividade e um espectro de ação muito mais amplo (Bussmann et al., 2010). Além disso, ae-Aa demonstrou eficácia antiparasitária contra parasitas monogenéticos em peixes (Ekanem & Brisibe, 2010) e a administração oral demonstrou eficácia na melhoria da saúde, resistência bacteriana e mitigação dos efeitos do estresse na tilápia do Nilo (Soares et al., 2020). Assim, parece que o ae-Aa é uma estratégia crucial para a obtenção de compostos bioativos de *A. annua* para serem usados contra bactérias.

A análise fitoquímica do ae-Aa e das frações revelou que a artemisinina e a deoxy-artemisinina foram os principais compostos bioativos, principalmente presentes no F3. Como a artemisinina comercial não teve eficácia antibacteriana, parece que a deoxy-artemisinina pode ser o componente antibacteriano, ou mesmo o efeito sinérgico desses componentes aumenta sua eficácia. Nossos achados corroboram os de Appalasamy et al. (2014) que também provou que a artemisinina isolada não tem efeito antibactericida, enquanto em conjunto com a deoxy-artemisinina, sugeriu ser o precursor da artemisinina, eles foram eficazes contra o *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp.

O presente estudo é o primeiro a relatar a atividade antibacteriana do extrato e frações alcoólicas de *A. annua* contra os principais patógenos bacterianos na piscicultura. É também o primeiro estudo a compreender a composição do *A. annua* e seus componentes bioativos contra bactérias de peixes. O ae-Aa e o F3 podem ser aplicados no tratamento de infecções bacterianas causadas por *A. hydrophila*, *F. columnare* e *S. agalactiae*, sendo uma bioalternativa para reduzir o uso de antibióticos sintéticos na piscicultura. Testes in vivo usando componentes bioativos ae-Aa devem ser realizados para estabelecer protocolos de tratamento contra doenças bacterianas na piscicultura.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à técnica de laboratório Camila Delarmelina pelo apoio e assistência durante o ensaio experimental. Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / CAPES,

Brasil. As atividades do presente estudo foram desenvolvidas em parceria com o projeto “BRS Aqua” uma colaboração entre o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, Embrapa, e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e apoio do Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia e Eliseu Alves Fundação.

## Referências

- Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry Allured Publishing Corp, Carol Stream, Illinois, USA.
- Appalasamy, S., Lo, K. Y., Ch'Ng, S. J., Nornadia, K., Othman, A. S., & Chan, L. K. (2014). Antimicrobial activity of artemisinin and precursor derived from in vitro plantlets of *Artemisia annua* L. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/215872>
- Busmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., ... Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.048>
- CLSI. (2005). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. *Agencia Nacional de Vigilância Sanitária*.
- Dhingra, V., Pakki, S. R., & Narasu., M. L. (2000). Antimicrobial activity of artemisinin and its precursors. *Current Science*, 709–713.
- Ekanem, A. P., & Brisibe, E. A. (2010). Effects of ethanol extract of *Artemisia annua* L. against monogenean parasites of *Heterobranchus longifilis*. *Parasitology Research*, 106(5), 1135–1139. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1787-0>
- Hamed, S. Ben, Ranzani-Paiva, M. J. T., Tachibana, L., Dias, D. de C., Ishikawa, C. M., & Esteban, M. A. (2018). Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 80(March), 550–562. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.053>
- Jessing, K. K., Duke, S. O., & Cedergreen, N. (2014). Potential Ecological Roles of Artemisinin Produced by *Artemisia annua* L. *Journal of Chemical Ecology*, 40(2), 100–117. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0384-6>
- Kim, W. S., Choi, W. J., Lee, S., Kim, W. J., Lee, D. C., Sohn, U. D., ... Kim, W. (2015). Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial effects of artemisinin extracts from *Artemisia annua* L. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 19(1), 21–27. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2015.19.1.21>
- Lio-Po, G. D., & Lim, L. H. S. (2014). Infectious diseases of warmwater fish in fresh water. In *Diseases and disorders of finfish in cage culture. 2nd edition*. Wallingford and Boston: CAB International (pp. 193–253).

- Majolo, C., da Rocha, S. I. B., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Bizzo, H. R. (2017). Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, *48*(5), 2380–2387. <https://doi.org/10.1111/are.13073>
- Romero, J., Feijóo, C. G., & Navarrete, P. (2012). Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. In *E.D. Carvalho, G.S. David, R.J. Silva (Eds.), Health and Environment in Aquaculture. In Tech, Rijeka, Croatia* (pp. 159–198).
- Slade, D., Galal, A. M., Gul, W., Radwan, M. M., Ahmed, S. A., Khan, S. I., ... ElSohly, M. A. (2009). Antiprotozoal, anticancer and antimicrobial activities of dihydroartemisinin acetal dimers and monomers. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *17*(23), 7949–7957. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.019>
- Soares, M. P., Cardoso, I. L., Ishikawa, M. M., de Oliveira, A. da S. S., Sartoratto, A., Jonsson, C. M., ... Sampaio, F. G. (2020). Effects of *Artemisia annua* alcohol extract on physiological and innate immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to improve health status. *Fish & Shellfish Immunology*, *105*(May), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.035>
- Tavares-Dias, M., & Martins, M. L. (2017). An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases*, *41*(4), 913–918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>
- Thøfner, I. C. N., Liebhart, D., Hess, M., Schou, T. W., Hess, C., Ivarsen, E., ... Christensen, J. P. (2012). Antihistomonal effects of artemisinin and *Artemisia annua* extracts in vitro could not be confirmed by in vivo experiments in turkeys and chickens. *Avian Pathology*, *41*(5), 487–496. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.714459>

Tabela 1. Rendimento das frações obtidas a partir do extrato alcoólico das folhas de *Artemisia annua*.

Frações	Peso (g)	Rendimento (%)
F1+2	0,0891	5,92
F3	0,7387	49,10
F4	0,1019	6,77
F5	0,0911	6,06
F6	0,3143	20,89

O resto da massa foi irreversivelmente adsorvido na fase estacionária.



Tabela 2. Constituintes químicos identificados por GC-MS no extrato alcoólico de *Artemisia annua* (ae-Aa) e frações obtidas de ae-Aa.

t <sub>R</sub> (min)	Composto	MM	% Relativa					
			ae-Aa	F1+2	F3	F4	F5	F6
3.405	Cânfora	152	1.36	nd	0.78	nd	nd	nd
7.454	Cariofileno	204	0.49	2.40	nd	nd	nd	nd
7.954	(E) - $\beta$ -Famesene	204	0.30	2.74	nd	nd	nd	nd
8.463	$\beta$ -Patchoulene	204	0.31	2.20	nd	0.96	nd	nd
10.581	Espatulenol	220	1.53	t	1.76	nd	nd	nd
10.715	Óxido de cariofileno	220	1.61	nd	1.67	nd	nd	nd
18.076	7-hidroxi-6-metoxi-cumarina	192	3.03	nd	1.25	6.97	nd	nd
19.685	Deoxy-Artemisinin	266	12.84	nd	17.00	4.57	7.50	2.66
19.908	$\beta$ -Humulene	204	t	nd	t	7.23	12.88	16.25
20.710	Artemisinina	282	15.21	nd	19.87	nd	nd	nd
20.900	Pitol	296	2.85	nd	1.90	3.52	12.32	19.51
23.598	Acetilcitrato de tributil	402	nd	2.25	nd	3.58	17.51	3.50
25.774	Adipato de dioctila	370	nd	t	t	0.95	4.10	t
28.115	Ácido benzenodicarboxílico	278	1.01	1.87	0.79	2.65	7.15	6.90
32.321	Squalene	410	1.13	11.96	nd	nd	nd	nd
33.153	Nonacosane	408	1.99	3.68	1.27	1.33	4.22	6.31
-	Compostos não identificados	-	57.95	72.90	55.38	68.24	34.31	44.87

t- traço; nd- não detectado. A identificação dos compostos por GC-MS foi realizada comparando os fragmentogramas com a biblioteca NIST-11 e dados descritos por Adams (2007).

Tabela 3. Atividade antibacteriana de artemisinina, extrato alcoólico de *Artemisia annua* (ae-Aa) e frações obtidas de ae-Aa em bactérias patogênicas de peixes.

Amostra	Cepas bacterianas				
	<i>Aeromonas hydrophila</i>		<i>Flavobacterium columnare</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
	ATCC 7966	isolado	isolado	ATCC 13813	isolado
	Concentração inibitória mínima (MIC) [mg.ml <sup>-1</sup> ]				
Artemisinina	na	na	na	na	na
ae-Aa	1.00	2.50	0.62	0.70	0.40
F1+2	na	na	na	na	na
F3	0.015	0.250	0.500	0.500	0.015
F4	0.031	2.000	1.000	1.000	0.015
F5	0.062	2.000	1.000	1.000	0.031
F6	0.031	2.000	1.000	1.000	0.125
Chloramphenicol <sup>a</sup>	0.0005	0.004	0.001	0.001	0.002
	Concentração bactericida mínima (MBC) [mg.ml <sup>-1</sup> ]				
Artemisinina	na	na	na	na	na
ae-Aa	1.00	2.50	1.25	0.70	0.40
F1+2	na	na	na	na	na
F3	0.015	0.250	2.000	2.000	1.000
F4	0.031	na	2.000	2.000	1.000
F5	0.062	na	2.000	2.000	0.125
F6	0.250	na	2.000	2.000	0.250

<sup>a</sup>Controle positivo. na = Nenhuma atividade nas concentrações testadas.

## Material suplementar

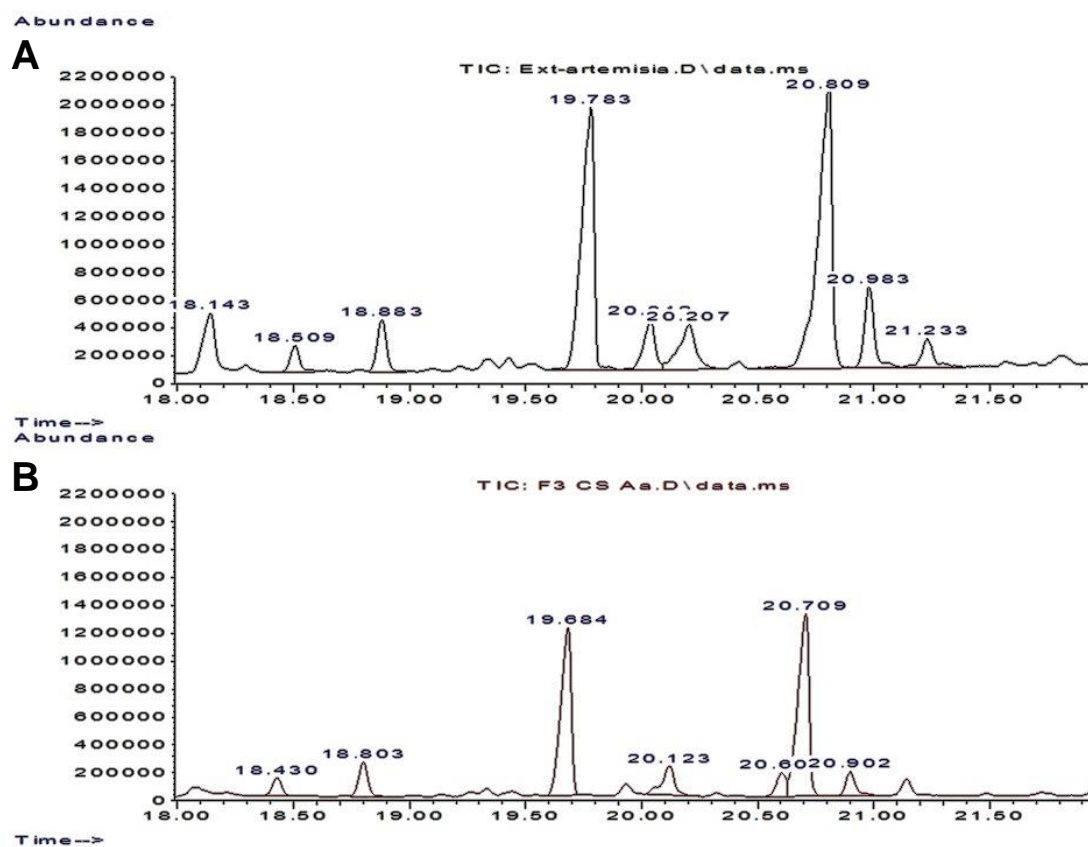


Figura 1. Detalhe dos cromatogramas obtidos por GC-MS do extrato alcoólico de *Artemisia annua* (A) e F3 (B).

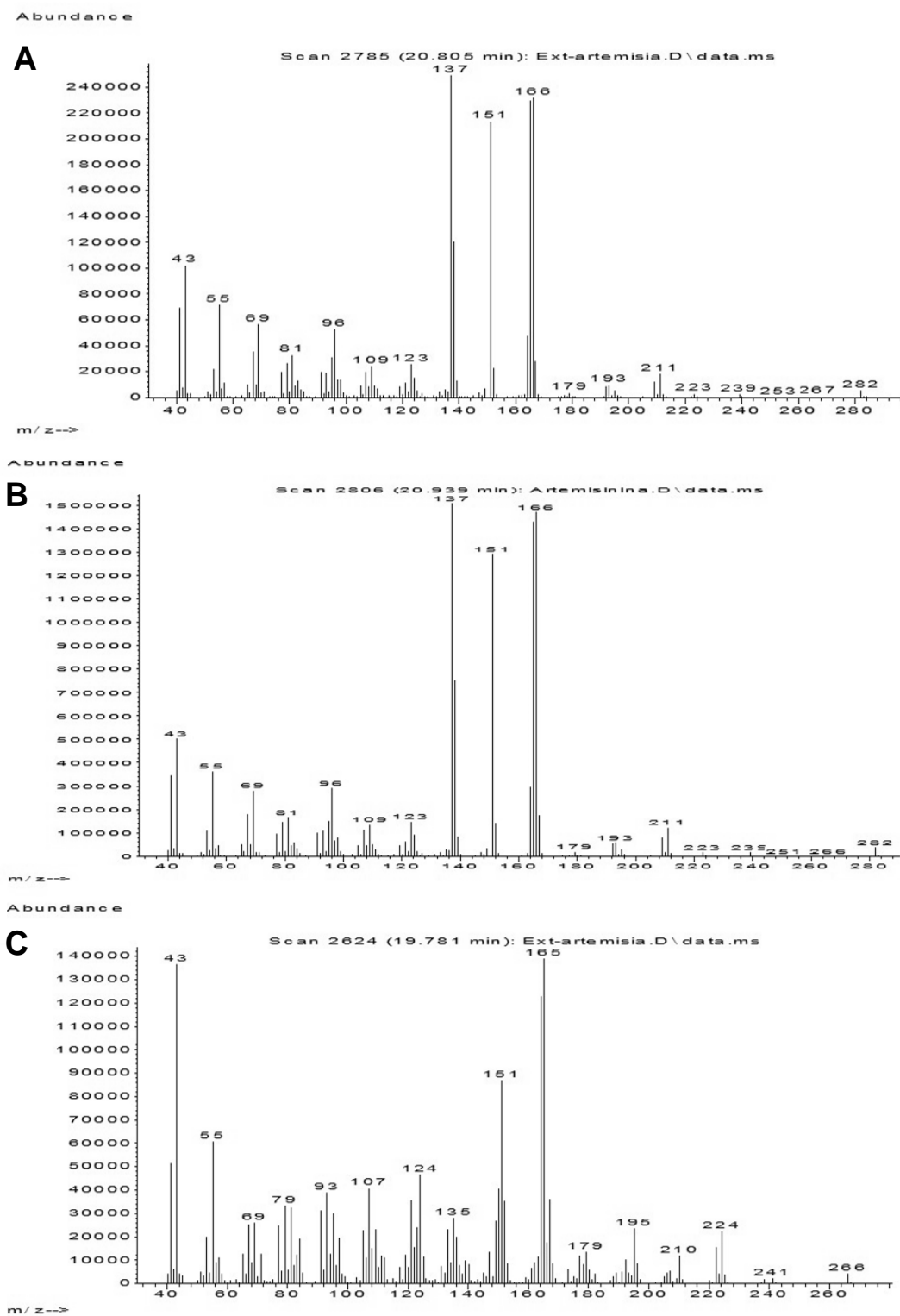


Figura 2. Espectro de massa obtido por GC-MS de artemisinina presente no extrato alcoólico de *Artemisia annua* (A), artemisinina padrão (B) e deoxy-artemisina (C).

## CAPÍTULO III

---

### Efeitos do extrato alcoólico de *Artemisia annua* na fisiologia e imunidade inata da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para melhorar o estado de saúde



Publicado: Soares, M. P., et al. Effects of *Artemisia annua* alcohol extract on physiological and innate immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to improve health status. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 105, p. 369-377, 2020.  
DOI: 10.1016/j.fsi.2020.07.035

## Resumo

As plantas são uma fonte potencial de moléculas ativas e são ambientalmente mais seguras e mais baratas do que os antibióticos sintéticos. Os compostos bioativos de *Artemisia annua* têm mostrado atividades farmacológicas e são usados globalmente como um suplemento. O presente estudo testou se a suplementação alimentar com extrato alcoólico da planta *A. annua* (ae-Aa; patente BR10201902707) melhora o estado de saúde de juvenis de tilápia do Nilo e aumenta a resistência a doenças quando os peixes são desafiados com a bactéria *Aeromonas hydrophila*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro grupos experimentais (0,0, 0,1, 0,25 e 0,5% de ae-Aa nas dietas) com cinco repetições (12 peixes por repetição/unidade experimental). Foram avaliados os níveis plasmáticos de glicose e cortisol, atividade respiratória dos leucócitos, proteína plasmática total, níveis de lisozima sérica, bem como o número de eritrócitos e leucócitos de peixes ao final dos 30 dias de alimentação (fase I) e 24h após exposição a bactérias (fase II). Os níveis de peroxidação lipídica, atividade da catalase e glutathione S-transferase dos peixes também foram analisados. A suplementação de 0,5% de ae-Aa foi suficiente para aumentar a explosão respiratória da atividade de leucócitos e lisozima, proteína plasmática total, trombócitos sanguíneos, neutrófilos e monócitos após desafio bacteriano ( $P < 0,05$ ), e resposta minimizada de estresse com diminuição da glicose plasmática e cortisol, e redução nos níveis de peroxidação lipídica ( $P < 0,05$ ). Os resultados do presente estudo sugerem que o ae-Aa como suplemento dietético apresenta benefícios, incluindo a suplementação com 0,5% de extrato de *A. annua* por 30 dias para minimizar a resposta ao estresse e modular a imunidade inata em tilápia do Nilo, proporcionando aos peixes maior resistência e proteção contra doenças.

**Palavras-chave:** *Artemisia annua* L, Artemisinina, Desafio bacteriano, Imunoestimulantes fitoterápicos, Estresse, Estresse oxidativo

## 1. Introdução

O peixe é a proteína animal mais consumida no mundo e é principalmente proveniente da piscicultura [1]. A capacidade da aquicultura de continuar abastecendo o mercado de pescado depende da intensificação da atividade. Semelhante a outros sistemas de produção, a intensificação está ligada a condições estressantes e maior suscetibilidade a novas doenças [2–4]. Os agentes patogênicos no ambiente aquático requerem o uso de antibióticos comercialmente disponíveis [5,6]. No entanto, o uso frequente de antibióticos pode promover patógenos altamente resistentes e levar à imunossupressão, desestabilização de bactérias gastrointestinais benéficas e ao acúmulo de antibióticos nos tecidos musculares dos peixes e na água [7–9]. A consciência pública dos riscos dos antibióticos levou a demandas por “peixes verdes”, que são peixes criados em um ambiente livre de antibióticos, e levou a um menor uso de antibióticos na aquicultura [10]. Estratégias alternativas de manejo, como o uso de imunoestimulantes e produtos naturais, podem facilitar a resistência a doenças infecciosas [10–13]. Plantas herbáceas apresentam grande potencial para melhorar a saúde de peixes cultivados por meio da modulação ou estimulação de componentes da imunidade inata (não específica) ou adaptativa (específica), além de promover desempenho de crescimento e utilização de nutrientes [14-17]. Extratos vegetais surgiram recentemente para uso complementar e alternativo na aquicultura devido ao seu menor custo, maior segurança e eficiência. Esses produtos são frequentemente incluídos como suplementos dietéticos durante atividades de manejo que causam estresse ou durante estágios cruciais da vida para ajudar os peixes a deter infecções de patógenos e manter uma boa saúde [18,19].

Ervas do gênero *Artemisia* são frequentemente usadas na saúde humana e pecuária para suas atividades antitumorais [20-23], antifúngicas [24], anticoagulantes [25], antidiabéticas [26] e antiinflamatórias [27,28]. *A. annua* é uma planta medicinal conhecida por sua alta eficiência biológica e baixa toxicidade [29,30], mas o conhecimento de seus benefícios para os peixes permanece limitado. *A. annua* é um produto profilático composto por diversos metabólitos secundários como cumarinas, terpenos, fenólicos (flavonóides e taninos), entre outros [31]. Esta planta medicinal é a única fonte de artemisinina, que é recomendada pela Organização Mundial da Saúde para o tratamento da malária [32]. Além disso, os medicamentos à base de artemisinina têm potencial antiparasitário e pesquisas anteriores demonstraram que a artemisinina é um potente agente anticâncer [33].

Os banhos terapêuticos com extrato etanólico de *A. annua* em concentrações variando de 50 a 200 mgL<sup>-1</sup> mostraram eficácia no tratamento de parasitas monogenéticos de *Heterobranchus longifilis* juvenil [34]. Além disso, a dieta suplementada com extrato vegetal integral de *A. annua* (20 g kg<sup>-1</sup> de ração) em *Carassius auratus* aumentou o efeito protetor contra infecção pela bactéria *Aeromonas hydrophila* após parasitismo por *Ichthyophthirius multifiliis*. No entanto, esses autores avaliaram apenas a incidência de infestação e mortalidade de animais. Atualmente não há informações sobre a ação de *A. annua* na fisiologia dos peixes de criação. Portanto, a dosagem e administração deste suplemento fitoterápico, bem como as condições fisiológicas das espécies de peixes devem ser identificadas para o uso efetivo de *A. annua* na aquicultura [35].



A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a segunda espécie de peixe mais cultivada no mundo [36] e, no Brasil, essa espécie se tornou a mais produzida na última década [37]. No entanto, os patógenos têm mostrado impactos notáveis na aquicultura em todo o mundo, incluindo perdas de aproximadamente 20% da produção [38]. Dentre os patógenos bacterianos, *A. hydrophila* se caracteriza como oportunista e é encontrado tanto na coluna d'água como na pele, brânquias e microbiota intestinal de peixes. Um desequilíbrio nos sistemas bactéria-hospedeiro-ambiente permite que este patógeno cause uma doença conhecida como septicemia e pode levar a perdas econômicas significativas para os piscicultores comerciais [39,40]. Portanto, é necessário testar a eficácia de produtos inovadores que visam melhorar a resistência imunológica da tilápia do Nilo, apoiando assim a produtividade crescente e a sustentabilidade da indústria de aquicultura. Assim, o objetivo do presente estudo foi testar se a suplementação dietética com extrato alcoólico da planta *A. annua* (patente BR10201902707) melhora a saúde de juvenis de tilápia do Nilo e aumenta a resistência a doenças quando peixes são desafiados com *A. hydrophila*.

## **2. Material e métodos**

### *2.1. Preparação da dieta experimental*

As dietas experimentais foram isoprotéicas e isoenergéticas [31% proteína digestível, 3,04 Mcal/kg de energia digestível] (Tabela 1) e formuladas de acordo com [41].

Os ingredientes da dieta foram moídos em moinho de facas (Marconi MA340, Piracicaba, SP, Brasil) para obtenção de granulometria de 0,5 mm,

pesados e misturados em misturador vertical tipo Y (Marconi MA201, Piracicaba, SP, Brasil), hidratado com água para obtenção de 20% de umidade e extrusada para obtenção de pellets de 2,5 mm de diâmetro em peletizadora de laboratório (G Paniz MCR22, Caxias do Sul, RS, Brasil).

O extrato alcoólico de *A. annua* (ae-Aa) contendo artemisinina (24,27%) e deoxy-artemisinina (20,55%) (Patente BR10201902707) foi adicionado à dieta formulada nos níveis de 0,00, 0,10, 0,25 e 0,50%, totalizando quatro tratamentos com cinco repetições por tratamento. As dietas foram secas em estufa de ar forçado (55 °C por 24 h) (Marconi MA035, Piracicaba, SP, Brasil) e armazenadas em geladeira a 5 °C até o uso.

## 2.2. Peixes e condições experimentais

Juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram obtidos em uma piscicultura comercial (Polettini, Mogi Mirim, SP, Brasil) e aclimatados ao sistema experimental. Os peixes foram alimentados com dieta controle por três semanas antes do experimento. O experimento foi dividido em duas fases, sendo a Fase I constituída por alimentação e suplementação e a Fase II o desafio bacteriano.

### 2.2.1. Fase I

Após o período de aclimação, 240 peixes foram anestesiados com benzocaína (100 mg L<sup>-1</sup>), pesados individualmente (24,33 ± 3,75 g) e distribuídos aleatoriamente em 20 aquários de vidro (300 L). Os aquários foram configurados como sistema de recirculação (4 L min<sup>-1</sup> por aquário) e incluíram controle de válvula individual, filtro físico e biológico (1500 L), temperatura controlada digitalmente e aeração suplementar. O volume total de água do

sistema de recirculação foi de 4800 L e a taxa de reposição foi de 80% por hora.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro grupos experimentais (níveis de ae-Aa nas dietas) com cinco repetições (12 peixes por repetição / unidade experimental). Os peixes foram alimentados diariamente e manualmente até a saciedade aparente às 08:00h, 11:00h, 13:00h e 16:30h, por 30 dias. As dietas foram pesadas diariamente antes da primeira e após a última alimentação para calcular a quantidade de dieta consumida.

O oxigênio dissolvido ( $6,10 \pm 0,70 \text{ mg L}^{-1}$ ), temperatura ( $25,00 \pm 0,89 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e pH ( $7,20 \pm 0,217$ ) foram medidos diariamente com uma sonda multiparâmetro (U-50, Horiba, Minami-ku, Kyoto, Japão) antes da primeira alimentação. A amônia total ( $0,16 \pm 0,10 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi medida semanalmente por meio de um kit comercial (Hach, Loveland, CO, EUA). Os aquários foram mantidos periodicamente por sifonagem e renovação de 20% do volume total do sistema. Todos os parâmetros de qualidade da água foram medidos em um aquário por tratamento do sistema de recirculação de água. Os valores dos parâmetros de qualidade da água encontrados neste estudo foram considerados adequados de acordo com [42].

Após 30 dias, dois peixes por unidade experimental (10 peixes por tratamento para um total de 40 peixes) foram utilizados para a obtenção de amostras de sangue e abatidos para coleta dos fígados. As amostras foram analisadas para parâmetros hematológicos e bioquímicos conforme descrito abaixo e para caracterizar a saúde dos peixes (condição) antes do início da Fase II. Os peixes já amostrados não retornaram às unidades experimentais.

### 2.2.2. Fase II

Todos os peixes remanescentes da Fase I foram inoculados na cavidade visceral com *Aeromona hydrophila* (ver preparação abaixo) por 24 horas e nenhum alimento foi administrado durante este período. Em seguida, dois peixes por unidade experimental foram anestesiados com benzocaína (100 mg L<sup>-1</sup>) para coleta de sangue e amostras de fígado para a caracterização de sua condição após o desafio bacteriano.

Os peixes restantes da Fase II foram observados por 15 dias e a sobrevivência foi registrada (%). Durante esse período, os animais de todos os grupos experimentais receberam dieta controle (sem inclusão de ae-Aa), de acordo com [43–45]. As condições de qualidade da água foram mantidas e os tanques foram limpos periodicamente.

### 2.3. Preparação de *Aeromonas hydrophila* para inoculação

A cepa *A. hydrophila* (KJ561021 LAPOA, Jaboticabal, São Paulo, Brasil) foi mantida em meio Brain Heart Infusion (BHI) com glicerol 30% (estéril) a -80 °C. Uma alíquota de 20 µL (cepa) foi inoculada em 5 mL de meio BHI autoclavada e incubada em incubadora bacteriológica a 28 °C por 24 h. Em seguida, 700 mL de meio BHI autoclavado foram adicionados e as alíquotas foram incubadas novamente seguindo o mesmo procedimento. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 12000 rpm por 20 min, e o sobrenadante foi descartado e tampão PBS (0,01 M) foi usado para lavar os pellets duas vezes, e então centrifugado a 12000 rpm por 20 min. A suspensão com  $1 \times 10^6$  CFU / mL<sup>-1</sup> de acordo com [46] foi ajustada de acordo com o padrão McFarland e lida em espectrofotômetro (SpectronicGenesys 5, Milton Roy Company, PA, EUA)

(OD<sub>600</sub> = 0,845), utilizando tampão PBS (0,01 M). A suspensão bacteriana foi previamente determinada para causar apenas infecção e nenhuma mortalidade grave, permitindo a estimulação do sistema imunológico dos peixes.

#### *2.4. Parâmetros hematológicos*

As amostras de sangue em ambas as fases experimentais foram coletadas por punção caudal com seringa lavada com EDTA (3%). O hematócrito (Ht) foi determinado pelo método do microhematócrito e as amostras foram processadas em centrífuga de microhematócrito (NI 1807 Nova Instruments, Piracicaba, SP, Brasil) por 5 min a 10.000 rpm. A hemoglobina (Hb) foi determinada por meio do kit de cianmetemoglobina (Labtest Diagnostica, Belo Horizonte, MG, Brasil). A contagem de eritrócitos (Rt) foi realizada em câmara de Neubauer após diluição do sangue em solução de citrato-formaldeído (1: 200). A concentração média de hemoglobina corpuscular também foi calculada.

Leucócitos totais, trombócitos totais e diferenciação de leucócitos foram realizados em esfregaço de sangue corado com May-Grunwald-Giemsa-Wright. A diferenciação e a contagem foram realizadas ao microscópio com objetiva de imersão em óleo (100 x).

#### *2.5. Parâmetros de estresse*

O sangue foi centrifugado e o plasma utilizado para determinar a concentração de glicose medida pela glicose oxidase (Labtest, São Paulo, Brasil, código 84) e as concentrações de cortisol por um ensaio

imunoenzimático usando um kit comercial (DRG International, Inc., EUA; Cortisol ELISA - EIA - 1887).

## 2.6. *Parâmetros imunológicos*

O sangue heparinizado foi coletado e processado para determinar a atividade respiratória dos leucócitos, conforme descrito em [47]. Este método consiste na determinação colorimétrica das espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pela explosão respiratória dos leucócitos, que promove a redução do nitroblue tetrazolium (NBT; Sigma, St. Louis, MO, EUA) em um precipitado azul escuro dentro do fagócito, referido como grânulos de formazan. A densidade óptica da solução final foi medida a 540 nm.

Após a extração do soro, a atividade da lisozima foi medida conforme descrito por [48], e com modificações parciais [49]. Os resultados foram expressos em unidades de lisozima sérica mL<sup>-1</sup>, onde uma unidade é definida como a quantidade de amostra que desencadeia uma redução na absorbância de 0,001 min<sup>-1</sup> a 450 nm quando comparada ao controle (suspensão de *Micrococcus luteus* sem soro).

## 2.7. *Biomarcadores de estresse oxidativo hepático*

Os peixes foram sacrificados por transecção da medula espinhal imediatamente após a coleta de sangue. Os fígados foram coletados e lavados com solução salina (NaCl 0,9%), secos com papel filtro, identificados e armazenados a -80 °C para posterior análise bioquímica. Para as avaliações dos níveis de peroxidação lipídica (LPO), atividade da catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), os tecidos amostrados foram pesados e

homogeneizados a 12.000 rpm em tampão fosfato por 30 minutos. A centrifugação foi realizada em centrífuga refrigerada Hermle-Z323K (Hermle Labortechnik, Alemanha) e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima.

A proteína hepática foi determinada de acordo com o método de Bradford [50], adaptado para o uso de um leitor de microplacas Dynex MRXTC 250, conforme descrito por [51]. A peroxidação lipídica foi quantificada usando o método de oxidação ferrosa-xilenol laranja (FOX), conforme descrito por [52], e a atividade CAT de acordo com [53] pela avaliação contínua da diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em  $\lambda = 240$  nm. A atividade GST foi medida de acordo com [54], usando I-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro SpectronicGenesys 5 (Milton Roy Company, PA, EUA), e as leituras de microplacas foram realizadas em um leitor Tecan-SNR (Sunrise-Basic Tecan, NS 1105003419 Groding, Áustria).

### *2.8. Análise estatística*

Todos os dados foram submetidos a testes de normalidade (Shapiro-Wilk), e as médias, submetidas a uma análise de variância (ANOVA de dois fatores). Para comparação das fases e suplementação, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 4 × 2, sendo quatro tratamentos (dieta controle, 0,1, 0,25 e 0,5% de ae-Aa) e duas épocas de amostragem (após o período de alimentação - Fase I e 24 h após a infecção - Fase II). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey com um valor de  $p < 0,05$ .

## 2.9. Declaração ética

Todos os procedimentos envolvendo animais do presente estudo foram realizados seguindo os princípios éticos em experimentação animal e aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna, SP, Brasil (Protocolo nº 003/2016) e da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, SP, Brasil (Protocolo nº 1518230217).

## 3. Resultados

A sobrevivência da tilápia do Nilo após exposição a *Aeromonas hydrophila* foi de 88% para o grupo sem ae-Aa e 96%, 100% e 100% para os peixes que receberam 0,10, 0,25 e 0,50% do extrato de ae-Aa, respectivamente.

Os diferentes níveis de suplementação alimentar de Ae-Aa e os tempos de amostragem, antes e depois da infecção por *A. hydrophila*, não mostraram interação para a maioria dos parâmetros analisados ( $P > 0,05$ ), com a porcentagem de linfócitos como exceção ( $P = 0,04$ ).

A exposição da tilápia do Nilo à *A. hydrophila* aumentou a glicose plasmática e o cortisol para todos os grupos experimentais, incluindo os peixes que não receberam ae-Aa ( $P < 0,001$ ). Por outro lado, todos os níveis de suplementação com ae-Aa diminuíram ( $P = 0,02$ ) a glicose plasmática da tilápia do Nilo quando comparada aos peixes que não receberam ae-Aa em ambas as fases (Fig. 1A). Os níveis de suplementação de 0,25 e 0,5% do ae-Aa diminuíram ( $P = 0,021$ ) o cortisol plasmático em ambas as fases (Fig. 1B).



A exposição da tilápia do Nilo à *A. hydrophila* aumentou o RAL ( $P < 0,001$ ), concentrações de lisozima sérica ( $P = 0,008$ ), proteína plasmática total ( $P < 0,001$ ), trombócitos ( $P = 0,004$ ), neutrófilos ( $P < 0,001$ ) e contagens de monócitos ( $P = 0,011$ ) para todos os grupos experimentais, incluindo peixes suplementados e peixes que não receberam ae-Aa (Fig. 1; Tabela 2). No entanto, o número total de leucócitos não apresentou alteração com a exposição a *A. hydrophila* ( $P > 0,05$ ).

Todos os níveis de suplementação de ae-Aa aumentaram RAL ( $P < 0,001$ ; Fig. 1C), concentrações séricas de lisozima ( $P = 0,045$ ; Fig. 1D), proteína plasmática total ( $P = 0,014$ ; Fig. 1E), leucócitos ( $P < 0,001$ ), contagem de trombócitos ( $P = 0,009$ ), neutrófilos ( $P = 0,007$ ) e monócitos ( $P = 0,015$ ) (Tabela 2) em tilápia do Nilo quando comparada a peixes que não receberam ae-Aa em ambas as fases. O maior aumento nas concentrações séricas de lisozima e proteína plasmática total foi observado em peixes que receberam 0,50% de ae-Aa em ambas as fases. Além disso, os peixes do grupo que recebeu 0,25 e 0,50% de ae-Aa apresentaram contagens maiores de leucócitos, trombócitos, neutrófilos e monócitos no sangue quando comparados aos demais tratamentos em ambas as fases (Tabela 2).

A porcentagem de linfócitos como resposta para tilápia do Nilo desafiada com *A. hydrophila* mostrou ser influenciada pelos níveis dietéticos de ae-Aa (Tabela 3). Antes do desafio bacteriano, os tratamentos com 0,1; 0,25 e 0,5% apresentaram menor número de linfócitos que o grupo controle ( $P < 0,001$ ). Após o desafio bacteriano, todos os tratamentos que receberam ae-Aa tiveram um número reduzido de linfócitos ( $P < 0,001$ ), e os grupos de peixes que foram

suplementados com níveis mais elevados de ae-Aa (0,25 e 0,50%) diminuíram 80% e 81% quando em comparação com o controle.

Ao comparar a tilápia do Nilo exposta a *A. hydrophila* com o grupo não exposto, todos os grupos experimentais apresentaram diminuição das concentrações de hemoglobina ( $P < 0,001$ ) e aumento do número de eritrócitos ( $P = 0,002$ ), percentual de hematócrito ( $P < 0,001$ ) e MCHC. Ao comparar os peixes que receberam o suplemento e os peixes que não receberam ae-Aa, os peixes não apresentaram diferenças na concentração de hemoglobina, número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito e MCHC em qualquer nível de inclusão ( $P > 0,05$ ) para ambas as fases.

A exposição da tilápia do Nilo à *A. hydrophila* aumentou o LPO do fígado para todos os grupos experimentais, incluindo peixes suplementados e peixes que não receberam ae-Aa ( $P < 0,001$ ). No entanto, as atividades de GST e CAT não mostraram alteração nos peixes expostos a *A. hydrophila* ( $P > 0,05$ ). Todos os níveis de suplementação com ae-Aa diminuíram ( $P = 0,001$ ) o LPO do fígado de tilápia do Nilo em comparação com os peixes que não receberam ae-Aa em ambas as fases (Fig. 2A). Nenhuma diferença foi mostrada entre os níveis de ae-Aa quando comparados aos peixes que não receberam ae-Aa em relação às atividades hepáticas de GST (Fig. 2B) e CAT (Fig. 2C) em ambas as fases ( $P > 0,05$ ).

#### **4. Discussão**

O extrato de ae-Aa apresentou benefícios potenciais para o sistema imunológico da tilápia do Nilo, promovendo melhores respostas bioquímicas, melhorando a resistência ao patógeno e garantindo maior sobrevivência ao

receber o suplemento nos 30 dias anteriores à exposição a *A. hydrophila*. Os resultados do presente estudo corroboram pesquisas anteriores, que relataram maior resistência e sobrevivência de diferentes espécies de peixes que foram infectados com uma variedade de doenças bacterianas e receberam uma dieta enriquecida com ervas medicinais [55-61]. A suplementação com extrato da planta *A. annua* por 45 dias mostrou eficácia no tratamento de peixes dourados (*Carassius auratus*) infectados com *Ichthyophthirius multifiliis* e aumento da sobrevivência dos peixes [62].

Revisões sobre as atividades biológicas do *A. annua* como antiinflamatória, antibacteriana e antioxidante aumentam a importância da investigação de seus efeitos [33]. Recentemente, a administração oral de plantas inteiras de *A. annua* e seus compostos foi relatada para peixes dourados (*Carassius auratus*) [62]. No entanto, o presente estudo é o primeiro a descrever os benefícios fisiológicos da administração do ae-Aa para a tilápia do Nilo por 30 dias antes da exposição a *A. hydrophila*.

Os peixes em condições de criação artificial são constantemente submetidos a estressores, resultando em uma cascata fisiológica de eventos que ajuda o organismo a reagir e, com sorte, se recuperar ou lidar com os estressores [63]. Portanto, quantificar os estressores de peixes durante as atividades de aquicultura é fundamental para estabelecer práticas de manejo adequadas [64]. Mais especificamente, as estratégias que reforçam o sistema imunológico para melhorar as respostas fisiológicas durante o estresse podem melhorar o desempenho dos peixes, evitando a mortalidade e, conseqüentemente, mitigar as perdas econômicas e os impactos ambientais do uso de antibióticos.

O cortisol plasmático e a glicose estão entre os indicadores mais comumente usados para o estresse dos peixes [65-67]. As concentrações plasmáticas de eritrócitos e hemoglobina também são indicadores de estresse úteis que refletem a capacidade do sangue de transportar oxigênio aos tecidos, suprindo as necessidades energéticas dos peixes em uma situação adversa [68]. No presente estudo, a tilápia do Nilo apresentou aumento nas concentrações plasmáticas de glicose, cortisol, eritrócito e hemoglobina após ser desafiada, indicando que os peixes estavam sob estresse. Ressalta-se que a suplementação com ae-Aa reduziu a concentração plasmática de glicose e cortisol da tilápia para ambas as fases experimentais quando comparada ao grupo que não recebeu suplemento, sugerindo o potencial do ae-Aa em reduzir os efeitos negativos do estresse. Estudos recentes têm mostrado que uma variedade de plantas é rica em metabólitos secundários que podem induzir atividades imunomoduladoras durante o estresse [10]. No entanto, os suplementos de plantas na aquicultura devem ser desenvolvidos para apoiar os componentes inatos e adaptativos do sistema imunológico, para prevenir infecções ao invés de atuar como um tratamento após um surto [69]. A diminuição dos níveis plasmáticos de glicose e cortisol e o aumento dos indicadores imunológicos inatos da tilápia do Nilo no presente estudo sugerem que a suplementação com extrato de ae-Aa por 30 dias antes da exposição a *A. hydrophila* melhorou a resposta imune em peixes.

A tilápia do Nilo suplementada com ae-Aa apresentou melhora nos parâmetros imunológicos, como atividade da lisozima sérica, proteína plasmática total e RAL, quando comparada a peixes que não receberam suplemento. Além disso, a suplementação com ae-Aa aumentou a presença de

leucócitos e trombócitos no sangue, o que pode aumentar a resistência dos peixes ao estresse. Um aumento na proteína plasmática total indica melhor imunidade, pois a lisozima e os fatores complementares representam uma fração da proteína plasmática total [54]. Poucos ou nenhum resultado foi encontrado usando *A. annua* para avaliar as respostas imunológicas dos peixes. Por outro lado, os benefícios de *A. annua* no sistema imunológico de frangos de corte incluem resistência aos efeitos deletérios do estresse térmico e aumento da imunidade celular e humoral [70,71]. Portanto, a suplementação de ae-Aa para tilápia durante 30 dias antes da infecção por *A. hydrofila* ativou o sistema imunológico dos peixes e fortaleceu a resposta imune, indicando a eficiência do extrato de ae-Aa como imunostimulante.

Vários imunostimulantes naturais conhecidos como imunomoduladores, restauradores imunológicos, imunoadjuvantes ou modificadores da resposta biológica podem normalizar ou modular processos fisiológicos [10,72]. Os extratos de ervas têm efeitos imunostimuladores inespecíficos em humanos e animais [73] e mostraram diferentes ações no sistema imunológico. Em peixes, a atividade biológica dos imunostimulantes à base de plantas ocorre por meio da modulação ou estimulação de componentes imunes inatos (não específicos) ou adaptativos (específicos), facilitando a fagocitose e a morte bacteriana por meio de macrófagos, linfócitos, vias do complemento e células citotóxicas inatas, resultando em maior resistência a doenças e proteção contra patógenos [10,74-77].

Os imunostimulantes podem inibir a geração de ânions oxidativos e eliminar os radicais livres [78-81], melhorando as defesas celulares e inibindo o dano oxidativo aos componentes celulares. Os compostos de ervas também

podem inibir a geração de ânions oxidativos e eliminar os radicais livres [82], e podem ser usados para mitigar os impactos dos estressores [83]. A *A. annua* está entre as plantas medicinais com maior capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), o que lhe confere uma alta atividade antioxidante [31,84]. No presente estudo, a lesão hepática relacionada ao estresse oxidativo induzido pela suplementação de ae-Aa foi avaliada pela medição das atividades de LPO e GST e CAT. A redução nos níveis de LPO na tilápia do Nilo que recebeu o ae-Aa sugere menor estresse oxidativo. Mesmo com o aumento da LPO hepática observada em todos os grupos experimentais expostos à *A. hydrophila*, os peixes que foram alimentados com ae-Aa antes da infecção apresentaram níveis mais baixos de LPO hepática quando comparados aos peixes que não receberam suplemento. Assim, a suplementação da tilápia do Nilo com ae-Aa mostrou eficácia em evitar o estresse oxidativo de peixes quando desafiados com *A. hydrophila*.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram os benefícios da suplementação da tilápia do Nilo com ae-Aa como estratégia para mitigar os efeitos das condições de estresse na aquicultura. A tilápia do Nilo alimentada com 0,5% de ae-Aa por 30 dias antes da exposição a *Aeromonas hydrophila* mostrou eficiência na modulação do sistema imunológico inato, proteção contra estresse oxidativo e aumento na resistência a doenças. Assim, os resultados deste estudo fornecem estratégias práticas para melhorar a saúde, a resistência bacteriana e, por sua vez, a produtividade da tilápia do Nilo na piscicultura por meio da suplementação alimentar de ae-Aa. Entretanto, a dose ótima de *A. annua* deve ser testada em peixes submetidos a outras condições de estresse, em diferentes espécies e em

diferentes sistemas de produção para elaborar o uso efetivo de ae-Aa como suplemento na aquicultura.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Piscicultura Polettini pela doação dos peixes para o presente estudo. Agradecemos também aos técnicos de laboratório Camila Delarmelina, Gino Vitorio Zambon, Marisa Pereira Carvalho e Ana Lucia Marigo pelo apoio e assistência durante o experimento. Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPEs, Brasil. As atividades do presente estudo foram desenvolvidas em parceria com o projeto “BRS Aqua” uma parceria entre o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, Embrapa e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e apoio do Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia e Fundação Eliseu Alves.

## Referências

- [1] FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations., 2018.
- [2] B. Barton, G.K. Iwama, Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids, *Annu. Rev. Fish Dis.* 1 (1991) 3–26. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G).
- [3] B.A. Barton, Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids, *Integr. Comp. Biol.* 42 (2002) 517–525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>.
- [4] G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter, C.B. Schreck, *Fish Stress and Health in Aquaculture*, Cambridge University Press, 2011.
- [5] J. Romero, C.G. Feijóo, P. Navarrete, 6 Antibiotics in Aquaculture-Use, Abuse and Alternatives, 200AD. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com).
- [6] F.C. Cabello, H.P. Godfrey, A. Tomova, L. Ivanova, H. Dölz, A. Millanao, A.H. Buschmann, Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health, *Environ. Microbiol.* 15 (2013) 1917–1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>.
- [7] D.J. Alderman, T.S. Hastings, Antibiotic use in aquaculture: Development of antibiotic resistance - Potential for consumer health risks, *Int. J. Food Sci. Technol.* 33 (1998) 139–155. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1998.3320139.x>.
- [8] M. Teuber, Veterinary use and antibiotic resistance, *Curr. Opin. Microbiol.* 4 (2001) 493–499.
- [9] J. Romero, C.G. Feijóo, P. Navarrete, Antibiotics in aquaculture–use, abuse and alternatives, in: E.D. Carvalho, G.S. David, R.J. Silva (Eds.), *Heal. Environ. Aquac. Tech*, Rijeka, Croat., 2012: pp. 159–198.
- [10] S.H. Hoseinifar, Y.Z. Sun, Z. Zhou, H. Van Doan, S.J. Davies, R. Harikrishnan, Boosting Immune Function and Disease Bio-Control Through Environment-Friendly and Sustainable Approaches in Finfish Aquaculture: Herbal Therapy Scenarios, *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 0 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1731420>.
- [11] D.K. Meena, P. Das, S. Kumar, S.C. Mandal, A.K. Prusty, S.K. Singh, M.S. Akhtar, B.K. Behera, K. Kumar, A.K. Pal, S.C. Mukherjee, Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review), *Fish Physiol. Biochem.* 39 (2013) 431–457. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9710-5>.



- [12] S.K. Song, B.R. Beck, D. Kim, J. Park, J. Kim, H.D. Kim, E. Ringø, Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review, *Fish Shellfish Immunol.* 40 (2014) 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>.
- [13] V. Kiron, Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care, *Anim. Feed Sci. Technol.* 173 (2012) 111–133. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015>.
- [14] H. Mansouri Taei, A. Hajimoradloo, S.H. Hoseinifar, H. Ahmadvand, Dietary Myrtle (*Myrtus communis* L.) improved non-specific immune parameters and bactericidal activity of skin mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings, *Fish Shellfish Immunol.* 64 (2017) 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.034>.
- [15] R. Safari, S.H. Hoseinifar, H. Van Doan, M. Dadar, The effects of dietary Myrtle (*Myrtus communis*) on skin mucus immune parameters and mRNA levels of growth, antioxidant and immune related genes in zebrafish (*Danio rerio*), *Fish Shellfish Immunol.* 66 (2017) 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.007>.
- [16] S.H. Hoseinifar, H. Khodadadian Zou, H. Kolangi Miandare, H. Van Doan, N. Romano, M. Dadar, Enrichment of common carp (*Cyprinus carpio*) diet with medlar (*Mespilus germanica*) leaf extract: Effects on skin mucosal immunity and growth performance, *Fish Shellfish Immunol.* 67 (2017) 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.023>.
- [17] S.H. Hoseinifar, H. Khodadadian Zou, H. Van Doan, R. Harikrishnan, M. Yousefi, H. Paknejad, E. Ahmadifar, Can dietary jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit extract alter cutaneous mucosal immunity, immune related genes expression in skin and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*)?, *Fish Shellfish Immunol.* 94 (2019) 705–710. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.016>.
- [18] A. Newaj-Fyzul, B. Austin, Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases, *J. Fish Dis.* 38 (2015) 937–955. <https://doi.org/10.1111/jfd.12313>.
- [19] A. Nawaz, S. Irshad, S.H. Hoseinifar, H. Xiong, The functionality of prebiotics as immunostimulant: Evidences from trials on terrestrial and aquatic animals, *Fish Shellfish Immunol.* 76 (2018) 272–278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.004>.
- [20] X. Bao, H. Yuan, C. Wang, J. Liu, M. Lan, Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi*, *Carbohydr. Polym.* 98 (2013) 1236–1243. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.018>.

- [21] E.-J. Choi, G.-H. Kim, Antioxidant and anticancer activity of *Artemisia princeps* var. *orientalis* extract in HepG2 and Hep3B hepatocellular carcinoma cells, *Chinese J. Cancer Res.* 25 (2013) 536–543.  
<https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2013.10.02>.
- [22] M. Khan, B. Yu, A. Rasul, A. Al Shawi, F. Yi, H. Yang, T. Ma, Jaceosidin induces apoptosis in U87 glioblastoma cells through G2/M phase arrest, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2012 (2012) 12.  
<https://doi.org/10.1155/2012/703034>.
- [23] J.H. Kim, S.H. Jung, Y.I. Yang, J.H. Ahn, J.G. Cho, K.T. Lee, N.I. Baek, J.H. Choi, *Artemisia* leaf extract induces apoptosis in human endometriotic cells through regulation of the p38 and NFκB pathways, *J. Ethnopharmacol.* 145 (2013) 767–775. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.003>.
- [24] G. Wenqiang, L. Shufen, Y. Ruixiang, H. Yanfeng, Comparison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Lévl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide, *Nat. Prod. Res.* 20 (2006) 992–998. <https://doi.org/10.1080/14786410600921599>.
- [25] R. Ryu, U.J. Jung, H.J. Kim, W. Lee, J.S. Bae, Y.B. Park, M.S. Choi, Anticoagulant and antiplatelet activities of *Artemisia princeps* pampanini and its bioactive components, *Prev. Nutr. Food Sci.* 18 (2013) 181–187.  
<https://doi.org/10.3746/pnf.2013.18.3.181>.
- [26] N. Yamamoto, Y. Kanemoto, M. Ueda, K. Kawasaki, I. Fukuda, H. Ashida, Anti-obesity and anti-diabetic effects of ethanol extract of *Artemisia princeps* in C57BL/6 mice fed a high-fat diet, *Food Funct.* 2 (2011) 45–52.  
<https://doi.org/10.1039/c0fo00129e>.
- [27] S. Wang, J. Li, J. Sun, K.W. Zeng, J.R. Cui, Y. Jiang, P.F. Tu, NO inhibitory guaianolide-derived terpenoids from *Artemisia argyi*, *Fitoterapia.* 85 (2013) 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.12.005>.
- [28] J. bo Wang, H. ping Zhao, Y. ling Zhao, C. Jin, D. jian Liu, W. jun Kong, F. Fang, L. Zhang, H. juan Wang, X. he Xiao, Hepatotoxicity or hepatoprotection? pattern recognition for the paradoxical effect of the chinese herb *rheum palmatum* L. in treating rat liver injury, *PLoS One.* 6 (2011) e24498.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024498>.
- [29] R.S. Bhakuni, D.C. Jain, R.P. Sharma, S. Kumar, Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity, *Curr. Sci.* 80 (2001) 35–48.
- [30] S. Tayebe, K. Mehrnaz, P. Khosro, H. Tahere, Morphological evaluation of hairy roots induced in *Artemisia annua* L. and investigating elicitation effects on the hairy roots biomass production, *Int. J. Agric. Res. Rev.* 2 (2012) 1005–1013.

- [31] E.A. Brisibe, U.E. Umoren, F. Brisibe, P.M. Magalhães, J.F.S. Ferreira, D. Luthria, X. Wu, R.L. Prior, Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L., *Food Chem.* 115 (2009) 1240–1246. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.033>.
- [32] WHO, Effectiveness of Non-Pharmaceutical Forms of *Artemisia annua* L. against malaria, *World Heal. Organ. Geneva* (2012) (June 2012).
- [33] A. Sadiq, M.Q. Hayat, M. Ashraf, Ethnopharmacology of *Artemisia annua* L.: A review, in: *Artemisia Annu. - Pharmacol. Biotechnol.*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014: pp. 9–25. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-41027-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-41027-7_2).
- [34] A.P. Ekanem, E.A. Brisibe, Effects of ethanol extract of *Artemisia annua* L. against monogenean parasites of *Heterobranchnus longifilis*, *Parasitol. Res.* 106 (2010) 1135–1139. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1787-0>.
- [35] M. Sakai, Current research status of fish immunostimulants, *Aquaculture.* 172 (1999) 63–92. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00436-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00436-0).
- [36] FAO, *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action.*, Rome, 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- [37] I.S. Vicente, F. Elias, C.E. Fonseca-Alves, Prospects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production in Brazil, *Rev. Ciências Agrárias.* 37 (2014) 392–398.
- [38] A. Sitjà-Bobadilla, B. Oidtmann, Integrated pathogen management strategies in fish farming, in: A. Press (Ed.), *Fish Dis.*, 2017: pp. 119–144. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128045640000053> (accessed August 13, 2019).
- [39] B.M.H. Rahman, S. Suzuki, K. Kawai, The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*, *J. Appl. Ichthyol.* 17 (2001) 282–285.
- [40] S. Ben Hamed, M.J.T. Ranzani-Paiva, L. Tachibana, D. de C. Dias, C.M. Ishikawa, M.A. Esteban, Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells, *Fish Shellfish Immunol.* 80 (2018) 550–562. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.053>.
- [41] I.G. Guimarães, L.E. Pezzato, M.M. Barros, L. Tachibana, Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia, *J. World Aquac. Soc.* 39 (2008) 781–789. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00214.x>.

- [42] N. Ibrahim, G. El Naggat, Water quality, fish production and economics of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and African catfish, *Clarias gariepinus*, monoculture and polycultures, *J. World Aquac. Soc.* 41 (2010) 574–582. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00397.x>.
- [43] S.S. Giri, V. Sukumaran, S.S. Sen, P.K. Jena, Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Bacillus subtilis* VSG1 singularly or in combination with *Lactobacillus plantarum* VSG3 or/and *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 on the growth, immunity and disease resistance of *Labeo rohita*, *Aquac. Nutr.* 20 (2014) 163–171. <https://doi.org/10.1111/anu.12062>.
- [44] V. Sukumaran, S.C. Park, S.S. Giri, Role of dietary ginger *Zingiber officinale* in improving growth performances and immune functions of *Labeo rohita* fingerlings, *Fish Shellfish Immunol.* 57 (2016) 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.056>.
- [45] S.S. Giri, S.S. Sen, C. Chi, H.J. Kim, S. Yun, S.C. Park, V. Sukumaran, Effect of guava leaves on the growth performance and cytokine gene expression of *Labeo rohita* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection, *Fish Shellfish Immunol.* 46 (2015) 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.051>.
- [46] S.W. Chen, C.H. Liu, S.Y. Hu, Dietary administration of probiotic *Paenibacillus ehimensis* NPUST1 with bacteriocin-like activity improves growth performance and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Fish Shellfish Immunol.* 84 (2019) 695–703. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.059>.
- [47] J. Biller-Takahashi, L. Takahashi, M. Saita, R. Gimbo, E. Urbinati, Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*, *Brazilian J. Biol.* 73 (2013) 425–429. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842013000200026>.
- [48] A.E. Ellis, Lysozyme assays, *Tech. Fish Immunol. SOS Public* (1990) 101–104.
- [49] J. Abreu, C. Marzocchi-Machado, A. Urbaczek, L. Fonseca, E. Urbinati, Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), *Brazilian J. Biol.* 69 (2009) 1133–1139. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842009000500018>.
- [50] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

- [51] N. Kruger, The Bradford method for protein quantification, *Met MolBiol.* 32 (1994) 9–15.
- [52] Z. Jiang, J. Hunt, S. Wolff, Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein, *Anal. Biochem.* 202 (1992) 384–389.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N).
- [53] H. Aebi, Catalase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, 3rd edn., Acad. Press. London. (1983) 273–286.
- [54] W. Habig, M. Pabst, W. Jakoby, Glutathione S-transferases, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7130–7139.
- [55] S. Sahu, B.K. Das, B.K. Mishra, J. Pradhan, N. Sarangi, Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*, *J. Appl. Ichthyol.* 23 (2007) 80–86. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00785.x>.
- [56] V. Pratheepa, S. Ramesh, N. Sukumaran, Immunomodulatory effect of *Aegle marmelos* leaf extract on freshwater fish *Cyprinus carpio* infected by bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*, *Pharm. Biol.* 48 (2010) 1224–1239.  
<https://doi.org/10.3109/13880201003713598>.
- [57] Q.K. Wang, C.X. Chen, Y.J. Guo, H.Y. Zhao, J.F. Sun, S. Ma, K.Z. Xing, Dietary polysaccharide from *Angelica sinensis* enhanced cellular defence responses and disease resistance of grouper *Epinephelus malabaricus*, *Aquac. Int.* 19 (2011) 945–956. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9412-x>.
- [58] A.D. Talpur, M. Ikhwanuddin, Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch), *Aquaculture.* 364–365 (2012) 6–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.035>.
- [59] R. Chakrabarti, P.K. Srivastava, Effect of dietary supplementation with *Achyranthes aspera* seed on larval rohu *Labeo rohita* challenged with *Aeromonas hydrophila*, *J. Aquat. Anim. Health.* 24 (2012) 213–218.  
<https://doi.org/10.1080/08997659.2012.694834>.
- [60] T. Pan, M. Yan, S. Chen, X. Wang, Effects of ten traditional Chinese herbs on immune response and disease resistance of *Sciaenops ocellatus* (Actinopterygii: Perciformes: Sciaenidae), *Acta Ichthyol. Piscat.* 43 (2013) 41–49. <https://doi.org/10.3750/AIP2013.43.1.06>.
- [61] A.D. Talpur, M. Ikhwanuddin, *Azadirachta indica* (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass,

- Lates calcarifer challenged with *Vibrio harveyi*, *Fish Shellfish Immunol.* 34 (2013) 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.003>.
- [62] Z. Wu, F. Ling, C. Song, W. Chen, G. Wang, Effects of oral administration of whole plants of *Artemisia annua* on *Ichthyophthirius multifiliis* and *Aeromonas hydrophila* after parasitism by *I. multifiliis*, *Parasitol. Res.* 116 (2016) 91–97. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5265-1>.
- [63] G. Jeney, M. Galeotti, D. Volpatti, Z. Jeney, D.P. Anderson, Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan, *Aquaculture.* 154 (1997) 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00042-2).
- [64] K.D. Cain, L. Grabowski, J. Reilly, M. Lytwyn, Immunomodulatory effects of a bacterial-derived  $\beta$ -1,3 glucan administered to tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in a *Spirulina*-based diet, *Aquac. Res.* 34 (2003) 1241–1244. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00934.x>.
- [65] I. Guerreiro, A. Couto, M. Machado, C. Castro, P. Pousão-Ferreira, A. Oliva-Teles, P. Enes, Prebiotics effect on immune and hepatic oxidative status and gut morphology of white sea bream (*Diplodus sargus*), *Fish Shellfish Immunol.* 50 (2016) 168–174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.023>.
- [66] L. Tort, Stress and immune modulation in fish, *Dev. Comp. Immunol.* 35 (2011) 1366–1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>.
- [67] P.R. Rauta, M. Samanta, H.R. Dash, B. Nayak, S. Das, Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses, *Immunol. Lett.* 158 (2014) 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.11.013>.
- [68] Y. Palti, Toll-like receptors in bony fish: From genomics to function, *Dev. Comp. Immunol.* 35 (2011) 1263–1272. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.006>.
- [69] S.H. Hoseinifar, H.K. Zou, H. Van Doan, H. Kolangi Miandare, S.M. Hoseini, Evaluation of some intestinal cytokines genes expression and serum innate immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf extract, *Aquac. Res.* 49 (2018) 120–127. <https://doi.org/10.1111/are.13440>.
- [70] L. Gholamrezaie Sani, M. Mohammadi, J. Jalali Sendi, S.A. Abolghasemi, M. Roostaie Ali Mehr, Extract and leaf powder effect of *Artemisia annua* on performance, cellular and humoral immunity in broilers, 2013. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2013.1384>.

- [71] Z.H. Song, K. Cheng, X.C. Zheng, H. Ahmad, L.L. Zhang, T. Wang, Effects of dietary supplementation with enzymatically treated *Artemisia annua* on growth performance, intestinal morphology, digestive enzyme activities, immunity, and antioxidant capacity of heat-stressed broilers, *Poult. Sci.* 97 (2017) 430–437. <https://doi.org/10.3382/ps/pex312>.
- [72] A. Puri, R. Saxena, R.P. Saxena, K.C. Saxena, V. Srivastava, J.S. Tandon, Immunostimulant activity of *Nyctanthes arbor-tristis* L., *J. Ethnopharmacol.* 42 (1994) 31–37. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90020-5).
- [73] G. Pandey, M. Sharma, Medicinal plants useful in fish diseases, *Plant Arch.* 12 (2012) 1–4.
- [74] A.A.M. Hassan, M.H. Yacout, M.S. Khalel, S.H.A. Hafsa, M.A.R. Ibrahim, D.N. Mocuta, A. Turek Rahoveanu, L. Dediu, Effects of Some Herbal Plant Supplements on Growth Performance and the Immune Response in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*), "Agriculture Life, *Life Agric. Conf. Proc.* 1 (2018) 134–141. <https://doi.org/10.2478/alife-2018-0020>.
- [75] N.N. Gabriel, J. Qiang, J. He, X.Y. Ma, M.D. Kpundeh, P. Xu, Dietary Aloe vera supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT), *Fish Shellfish Immunol.* 44 (2015) 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.002>.
- [76] S.M. Hoseini, M. Yousefi, S.H. Hoseinifar, H. Van Doan, Antioxidant, enzymatic and hematological responses of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with myrcene- or menthol-supplemented diets and exposed to ambient ammonia, *Aquaculture.* 506 (2019) 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.048>.
- [77] H. Rajabiesterabadi, M. Yousefi, S.M. Hoseini, Enhanced haematological and immune responses in common carp *Cyprinus carpio* fed with olive leaf extract-supplemented diets and subjected to ambient ammonia, *Aquac. Nutr.* 26 (2020) 763–771. <https://doi.org/10.1111/anu.13035>.
- [78] R. Harikrishnan, C. Balasundaram, M.S. Heo, Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish, *Aquaculture.* 317 (2011) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>.
- [79] N. Van Hai, The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review, *Aquaculture.* 446 (2015) 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.014>.

- [80] B. Vaseeharan, R. Thaya, Medicinal plant derivatives as immunostimulants: An alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture, *Aquac. Int.* 22 (2014) 1079–1091. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9729-3>.
- [81] C. Bulfon, D. Volpatti, M. Galeotti, Current research on the use of plant-derived products in farmed fish, *Aquac. Res.* 46 (2015) 513–551. <https://doi.org/10.1111/are.12238>.
- [82] T. Citarasu, Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry, *Aquac. Int.* 18 (2010) 403–414. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7>.
- [83] S.B. Chakraborty, C. Hancz, Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture, *Rev. Aquac.* 3 (2011) 103–119. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x>.
- [84] J.F.S. Ferreira, D.L. Luthria, T. Sasaki, A. Heyerick, Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer, *Molecules.* 15 (2010) 3135–3170. <https://doi.org/10.3390/molecules15053135>.



Tabela 1. Formulação e composição química das dietas experimentais.

Ingrediente	<i>Extrato de A. annua</i> (%)			
	0,00	0,10	0,25	0,50
Farelo de soja (45%) <sup>1</sup>	59,00	58,90	58,75	58,50
Farelo de milho <sup>2</sup>	13,20	13,10	12,95	12,70
Farelo de trigo <sup>1</sup>	19,30	19,30	19,30	19,30
Óleo de soja	1,20	1,20	1,20	1,20
Fosfato dicálcico	3,46	3,46	3,46	3,46
Aglutinante	1,98	1,98	1,98	1,98
Bicarbonato de Sódio	0,25	0,25	0,25	0,25
DL-Metionina (99%)	0,44	0,44	0,44	0,44
L-Isoleucina	0,25	0,25	0,25	0,25
L-Histidina	0,16	0,16	0,16	0,16
L-Valina	0,04	0,04	0,04	0,04
Cloreto de sódio (NaCl)	0,10	0,10	0,10	0,10
Vitamina e mineral premix <sup>3</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT (butil hidroxitolueno)	0,02	0,02	0,02	0,02
Total	100	100	100	100
Níveis de nutrientes calculados <sup>4</sup>				
Proteína digestível (%)	31,08			
Energia digestível (Mcal/kg)	3,0406			
Cálcio (%)	1,07			
Fósforo disponível (%)	0,73			
Composição analisada <sup>5</sup>				
<i>Extrato de Artemisia annua</i> (%)	0,00	0,10	0,25	0,50
Proteína bruta (%)	31,86	31,39	32,72	32,40
Extrato etéreo (%)	2,39	3,09	3,15	3,03
Fibra bruta (%)	25,03	23,31	26,32	25,39
Matéria seca (%)	90,39	93,56	92,57	90,16
Matéria orgânica (%)	91,53	91,49	91,60	91,49
Carboidrato total (%)	56,79	57,01	55,73	54,06
Carboidratos não fibrosos (%)	28,76	28,70	29,41	28,67
Cinza (%)	7,64	8,07	8,00	8,05

<sup>1</sup> De acordo com [85], como g kg<sup>-1</sup> de matéria seca: farelo de soja (19,3 MJ kg<sup>-1</sup> de energia bruta, 512,1 de proteína bruta, 14,8 de lipídios totais, 71,2 de fibra bruta, 74,4 gramas), subprodutos de aves (20,4 MJ kg<sup>-1</sup> energia bruta, 627,9 proteína bruta, 171,8 lipídios totais, 183,2 gramas) e farinha de glúten de milho (20,6 MJ kg<sup>-1</sup> de energia bruta, 700,7 proteína bruta, 94,8 lipídio bruto, 8,3 fibra bruta, 17,0 cinza). <sup>2</sup> De acordo com [41], como g kg<sup>-1</sup> de matéria seca: milho (16,9 MJ kg<sup>-1</sup> de energia bruta, 72,1 de proteína bruta, 42,4 lipídios totais, 20,0 de fibra bruta, 12,0 gramas), arroz (15,5 MJ kg<sup>-1</sup> de energia bruta, 82,1 proteína bruta, 82,6 lipídios totais, 7,50 fibra bruta, 7,80 cinza). <sup>3</sup> Composição da pré-mistura de vitaminas e minerais (Vaccinar, Belo Horizonte, MG, Brasil) kg dieta<sup>-1</sup>.117: vitamina A: 500.000 UI, vitamina D3, 250.000 UI, vitamina E 5.000 mg, vitamina K3, 500 mg, vitamina B1 1.000 mg, vitamina B2: 1.000 mg, vitamina B6: 1.000 mg, vitamina B12: 2.000 mg, niacina: 2.500, ácido fólico: 500 mg, biotina: 10 mg, vitamina C 10.000 mg, colina: 100.000 mg, Inositol: 1.000 mg, selênio: 30 mg, ferro: 5.000 mg, cobre: 1.000 mg, manganês: 5.000 mg, zinco: 9.000 mg, cobalto: 50 mg, iodo: 200 mg. <sup>4</sup> Níveis de nutrientes calculados de acordo com os níveis de nutrientes. <sup>5</sup> Valores determinados de acordo com as metodologias descritas por [86].

Tabela 2. Contagem de leucócitos, trombócitos, neutrófilos e monócitos em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato alcoólico de *Artemisia annua* (%) por 30 dias (Fase I) e após exposição a *Aeromonas hydrophila* (Fase II).

	Extrato de <i>A. annua</i> (%)	Leucócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	Trombócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	Neutrófilos (%)	Monócitos (%)
Fase I	0,00	9,16±1,00 <sup>ba</sup>	20,64±1,39 <sup>bb</sup>	11,50±0,87 <sup>bb</sup>	13,25±1,38 <sup>bb</sup>
	0,10	12,23±0,93 <sup>abA</sup>	27,00±2,85 <sup>abB</sup>	13,63±1,89 <sup>abB</sup>	17,25±1,44 <sup>abB</sup>
	0,25	16,45±1,69 <sup>aA</sup>	31,04±1,72 <sup>aB</sup>	15,75±4,56 <sup>aB</sup>	20,25±3,48 <sup>aB</sup>
	0,50	16,46±2,53 <sup>aA</sup>	31,88±2,52 <sup>aB</sup>	18,75±3,37 <sup>aB</sup>	24,00±3,25 <sup>aB</sup>
Fase II	0,00	11,03±0,79 <sup>ba</sup>	28,30±1,27 <sup>ba</sup>	38,63±1,33 <sup>ba</sup>	15,38±2,16 <sup>ba</sup>
	0,10	14,27±1,49 <sup>abA</sup>	34,62±2,97 <sup>abA</sup>	58,38±6,03 <sup>abA</sup>	29,50±4,23 <sup>abA</sup>
	0,25	18,80±2,59 <sup>aA</sup>	38,55±5,33 <sup>aA</sup>	60,75±5,53 <sup>aA</sup>	31,00±5,87 <sup>aA</sup>
	0,50	18,67±2,34 <sup>aA</sup>	38,33±4,93 <sup>aA</sup>	61,38±6,07 <sup>aA</sup>	28,25±5,46 <sup>aA</sup>

Values are expressed as mean  $\pm$  standard error. Mean values of thrombocytes and leukocytes  $\times 10^3$ . Small letters compare the treatments in each phase and capital letters compare the phases in each treatment within columns ( $P < 0.05$ ).

Tabela 3. Contagem de linfócitos em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato alcoólico de *Artemisia annua* (%) por 30 dias (Fase I) e após exposição a *Aeromonas hydrophila* (Fase II).

Time	Extrato de <i>A. annua</i> (%)				Total
	0,00	0,10	0,25	0,50	
Linfócitos (%)					
Fase I	69,25±1,92	58,50±3,62	58,50±1,34	54,13±4,92	59,97±3,24 <sup>A</sup>
Fase II	30,25±3,68	19,50±1,29	6,13±0,92	5,63±1,16	15,38±5,91 <sup>B</sup>
Total	49,75±7,62 <sup>a</sup>	38,75±7,49 <sup>ab</sup>	32,31±9,93 <sup>ab</sup>	29,88±9,46 <sup>b</sup>	

Os valores são expressos como média ± erro padrão. As letras minúsculas diferem nas linhas e as maiúsculas diferem nas colunas (P <0,05).

Tabela 4. Número de eritrócitos, concentrações de hemoglobina, hematócrito e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato alcoólico de *Artemisia annua* (%) por 30 dias (Fase I) e após exposição a *Aeromonas hydrophila* (Fase II).

	Extrato de <i>A. annua</i> (%)	Eritrócitos ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	Hemoglobina ( $\text{g dL}^{-1}$ )	Hematócrito (%)	MCHC ( $\text{gdL}^{-1}$ )
Fase I	0,00	1,69 $\pm$ 0,14 <sup>aB</sup>	14,22 $\pm$ 0,64 <sup>aA</sup>	29,25 $\pm$ 1,89 <sup>aB</sup>	26,51 $\pm$ 0,81 <sup>aB</sup>
	0,10	1,82 $\pm$ 0,14 <sup>aB</sup>	11,46 $\pm$ 0,56 <sup>aA</sup>	29,00 $\pm$ 1,89 <sup>aB</sup>	25,71 $\pm$ 2,04 <sup>aB</sup>
	0,25	1,99 $\pm$ 0,15 <sup>aB</sup>	13,55 $\pm$ 1,16 <sup>aA</sup>	30,11 $\pm$ 1,55 <sup>aB</sup>	26,16 $\pm$ 1,39 <sup>aB</sup>
	0,50	2,19 $\pm$ 0,38 <sup>aB</sup>	12,29 $\pm$ 0,74 <sup>aA</sup>	30,75 $\pm$ 1,13 <sup>aB</sup>	26,07 $\pm$ 1,56 <sup>aB</sup>
Fase II	0,00	2,37 $\pm$ 0,19 <sup>aA</sup>	8,76 $\pm$ 0,38 <sup>aB</sup>	33,25 $\pm$ 0,84 <sup>aA</sup>	47,14 $\pm$ 2,32 <sup>aA</sup>
	0,10	2,11 $\pm$ 0,26 <sup>aA</sup>	9,31 $\pm$ 0,64 <sup>aB</sup>	35,50 $\pm$ 0,33 <sup>aA</sup>	43,67 $\pm$ 3,09 <sup>aA</sup>
	0,25	2,45 $\pm$ 0,16 <sup>aA</sup>	8,74 $\pm$ 0,44 <sup>aB</sup>	34,11 $\pm$ 1,11 <sup>aA</sup>	46,85 $\pm$ 3,70 <sup>aA</sup>
	0,50	2,31 $\pm$ 0,22 <sup>aA</sup>	8,02 $\pm$ 0,67 <sup>aB</sup>	34,29 $\pm$ 1,04 <sup>aA</sup>	49,44 $\pm$ 8,75 <sup>aA</sup>

Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão. As letras minúsculas comparam os tratamentos em cada fase e as maiúsculas comparam as fases em cada tratamento dentro da coluna ( $P < 0,05$ ).

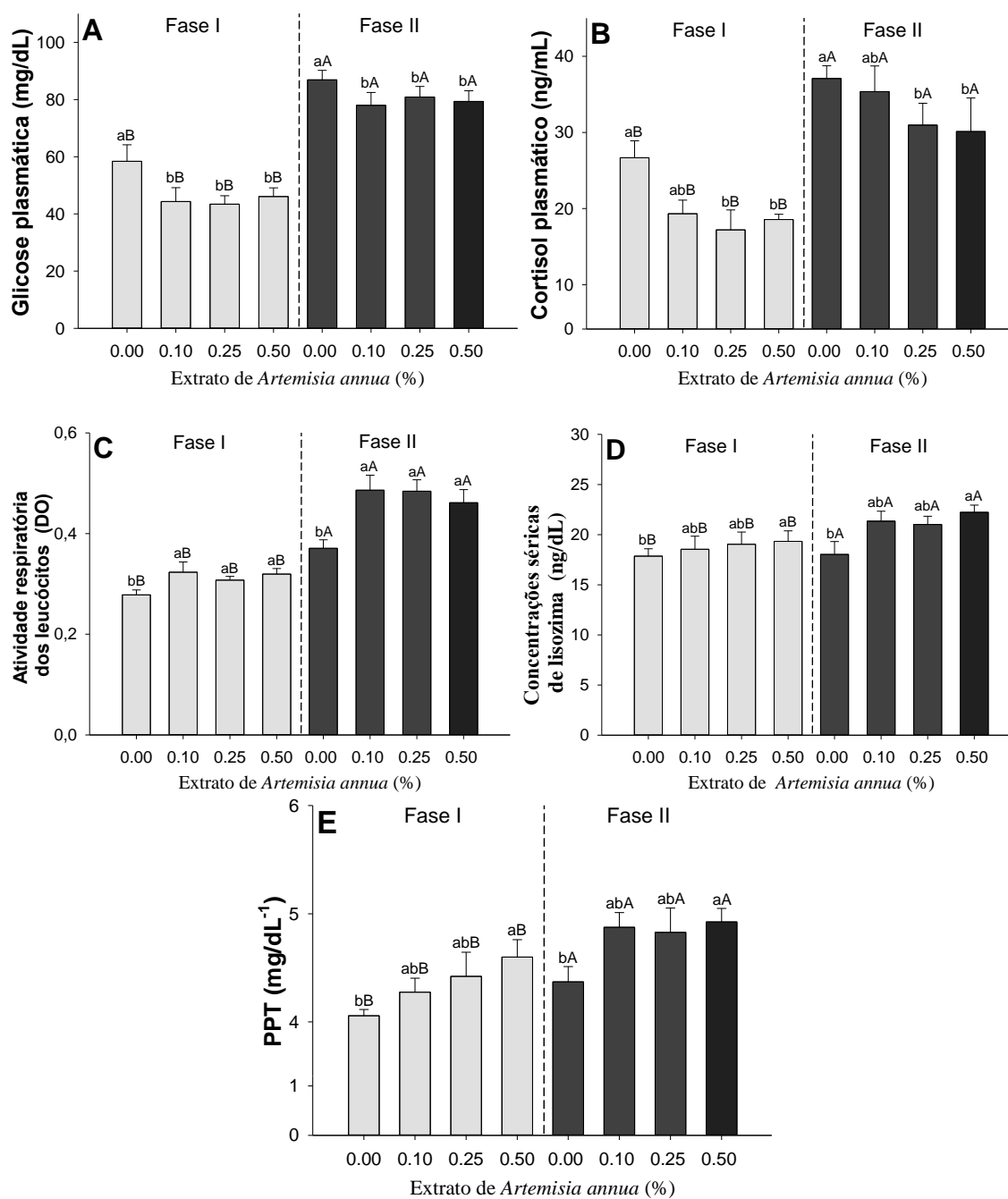


Figura 1. Valores das concentrações plasmáticas de glicose (A), concentrações plasmáticas de cortisol (B), atividade respiratória dos leucócitos (C), concentrações séricas de lisozima (D) e proteína plasmática total - PPT (E) em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com dietas contendo níveis graduados de extrato alcoólico de *Artemisia annua* (%) por 30 dias (Fase I) e após inoculação com *Aeromonas hydrophila* (Fase II). Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. As letras minúsculas comparam os tratamentos em cada fase e as maiúsculas comparam as fases em cada tratamento ( $P < 0,05$ ).

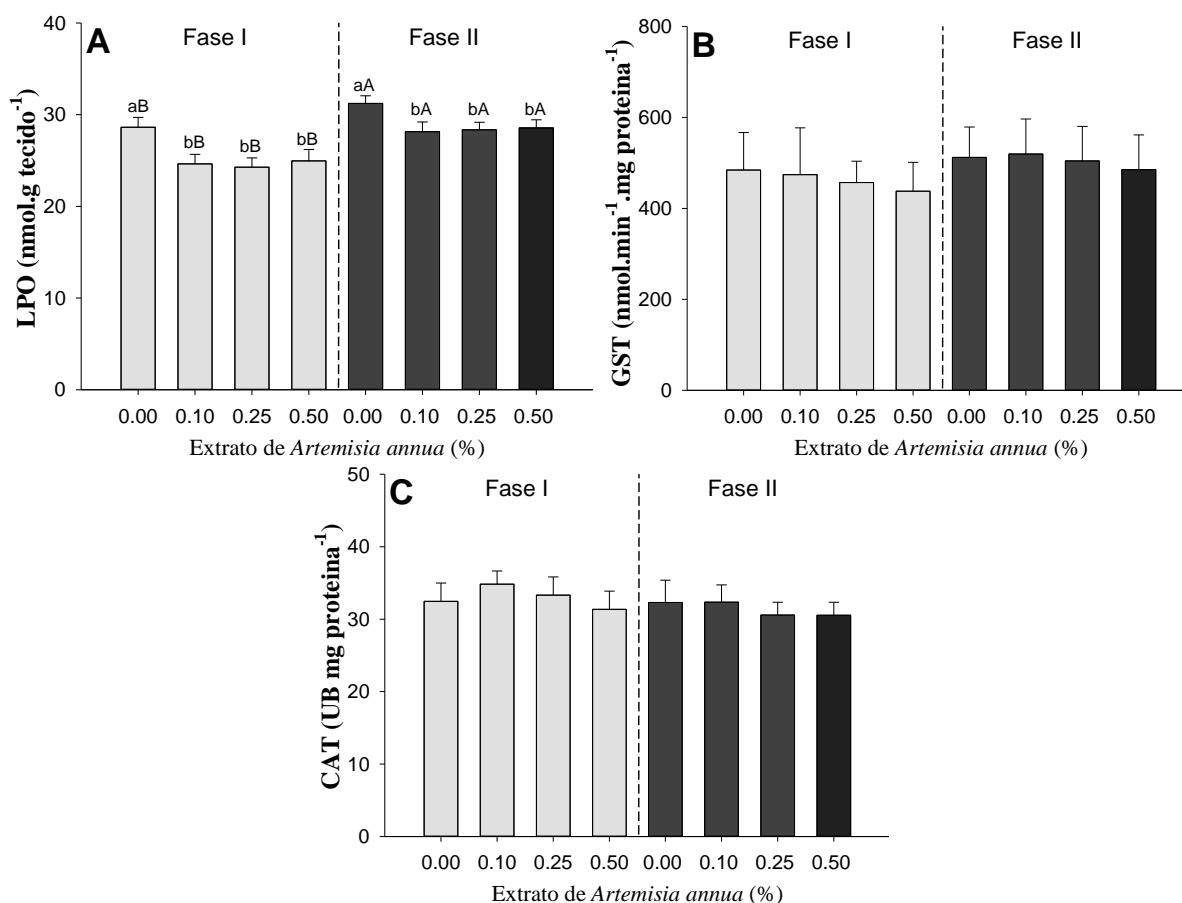


Figura 2. Níveis de peroxidação lipídica - LPO (A) e atividade da glutathione S-transferase - GST (B) e atividade da catalase - CAT (C) em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com dietas contendo níveis graduados de extrato alcoólico de *Artemisia annua* (%) por 30 dias (Fase I) e após inoculação com *Aeromonas hydrophila* (Fase II). Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. As letras minúsculas comparam os tratamentos em cada fase e as maiúsculas comparam as fases em cada tratamento ( $P < 0,05$ ).

## CAPÍTULO IV

---

### Eficiência do extrato alcoólico de *Artemisia annua* no desempenho e morfologia intestinal da tilápia do Nilo



## Resumo

A administração de aditivos naturais para rações tem sido sugerida como um meio de imunomodulação e promotor de crescimento ecologicamente correto em alternativas aos antibióticos. Neste estudo, foi investigado o efeito do extrato alcoólico de *Artemisia annua* (ea-Aa) sobre o desempenho de crescimento e morfologia intestinal da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os peixes com peso inicial ( $24,33 \pm 3,75$  g) foram alimentados com níveis crescentes de ea-Aa (0,00, 0,10, 0,25 e 0,50%) por 30 dias. Os resultados mostraram que o desempenho de crescimento (ganho de peso, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência proteica) em peixes alimentados com ea-Aa aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) e a taxa de conversão alimentar foi melhorada em comparação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). As dietas suplementadas com 0,25 e 0,5% de ea-Aa aumentaram ( $P < 0,05$ ) o perímetro, altura e espessura do vilo, profundidade da cripta, razão vilo:cripta e o número de células caliciformes no trato gastrointestinal da tilápia do Nilo. Portanto, pode-se concluir que ea-Aa melhora a morfologia intestinal, tem um potencial considerável como suplemento promotor de crescimento e melhora na eficiência produtiva da tilápia do Nilo.

**Palavras-chave:** *Artemisia annua* L, Artemisinina, Aditivos naturais, Imunoestimulantes fitoterápicos, Promotor de crescimento



## 1. Introdução

A gestão da saúde, tanto dos animais em cultivo quanto do consumidor, é uma grande preocupação na aquicultura, para alcançar o máximo rendimento da produção e fornecer produtos de alta qualidade para consumo humano. A consciência dos riscos dos antibióticos levou a demandas por “peixes verdes”, que são peixes criados em um ambiente livre de antibióticos, contribuindo com a tendência de diminuir o uso de antibióticos na aquicultura [1]. Dentre as abordagens disponíveis na indústria da aquicultura, a administração de aditivos para rações tem sido sugerida como um meio de imunomodulação e promotor de crescimento ecologicamente correto, que recebem interesse crescente como alternativas aos antibióticos [1,2]. Na produção animal, entre os aditivos incluídos na ração, estão as substâncias ativas fitogênicas, que são naturais, menos tóxicas e livres de resíduos, consideradas ideais como promotoras de crescimento e para melhorar a morfologia intestinal, sem um efeito prejudicial na qualidade da carne [3,4], garantindo assim maior eficiência produtiva.

Entre os aditivos fitogênicos como opções ao bom desempenho, sem o uso de antibióticos, a *Artemisia annua* tem se destacado recentemente para uso na produção animal. A suplementação de extrato aquoso de *A. annua* melhorou o desempenho do crescimento e função antioxidante em frangos de corte [5]. Além disso, *A. annua* tratada enzimaticamente melhorou o desempenho do crescimento, morfologia intestinal e aumentou a capacidade antioxidante intestinal de leitões desmamados [6]. Em peixes, o extrato alcoólico de *A. annua* mostrou potencial considerável como um promotor de crescimento para o cultivo da carpa comum (*Cyprinus carpio*) [7]. Além da artemisinina, a *A. annua* contém vários nutrientes, como vitaminas,

aminoácidos e minerais, bem como compostos antioxidantes, incluindo polifenóis e flavonóides [8], que agem sozinhos ou sinergicamente, garantido esses efeitos. Estudos avaliando o uso de plantas medicinais mostram que os extratos etanólicos apresentam maior atividade e um espectro de ação muito mais amplo [9], sendo uma boa opção como suplemento fitogênico para peixes. Entretanto, para o seu uso efetivo na aquicultura a dosagem e administração, bem como seu efeito em diferentes espécies de peixes devem ser identificadas [10].

O cultivo de tilápia do Nilo é o tipo de aquicultura mais difundido no mundo [11], e sua popularidade continua aumentando devido à relativa facilidade de cultivo. Portanto, é crescente e de interesse dos produtores a capacidade de maximizar a produção de tilápia a um custo reduzido, ao mesmo tempo que fornece proteína para a população humana. Após avaliarmos em um primeiro estudo a eficiência do ea-Aa na imunomodulação e resistência à *Aeromonas hydrophila* na tilápia do Nilo [12] optou-se pela continuidade do estudo buscando padronizar os componentes bioativos da *A. annua* que podem atuar como promotores de crescimento e estabelecer métodos para otimizar seu uso. Assim, avaliamos se a suplementação com ea-Aa por 30 dias melhora o desempenho de crescimento e a morfologia intestinal da tilápia do Nilo.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Preparação de dieta experimental*

As dietas experimentais foram isoprotéicas e isoenergéticas [31% proteína digestível, 3,04 Mcal/kg de energia digestível] (Tabela 1) e formuladas de acordo com Guimarães e colaboradores [13].

Os ingredientes da dieta foram moídos em moinho de facas (Marconi MA340, Piracicaba, SP, Brasil) para obtenção de granulometria de 0,5 mm, pesados e misturados em misturador vertical tipo Y (Marconi MA201, Piracicaba, SP, Brasil), hidratado com água para obtenção de 20% de umidade e extrusada para obtenção de pellets de 2,5 mm de diâmetro em peletizadora de laboratório (G Paniz MCR22, Caxias do Sul, RS, Brasil).

O ea-Aa contendo artemisinina (24,27%) e desoxi-artemisinina (20,55%) (Patente BR10201902707) foi adicionado à dieta formulada nos níveis de 0,00, 0,10, 0,25 e 0,50%, totalizando quatro tratamentos com cinco repetições por tratamento. As dietas foram secas em estufa de ar forçado (55 °C por 24 h) (Marconi MA035, Piracicaba, SP, Brasil) e armazenadas em geladeira a 5 °C até o uso.

## *2.2. Peixes e condições experimentais*

Juvenis de tilápia do Nilo foram obtidos em uma piscicultura comercial (Polettini, Mogi Mirim, SP, Brasil) e aclimatados ao sistema experimental. Os peixes foram alimentados com dieta controle por três semanas antes do experimento.

Após o período de aclimação, 240 peixes foram anestesiados com benzocaína (100 mg.L<sup>-1</sup>), pesados individualmente (24,33 ± 3,75 g) e distribuídos aleatoriamente em 20 aquários de vidro (300 L). Os aquários foram configurados como sistema de recirculação (4 L.min<sup>-1</sup> por aquário) e incluíram controle de válvula individual, filtro físico e biológico (1500 L), temperatura controlada digitalmente e aeração suplementar. O volume total de água do

sistema de recirculação foi de 4800 L e a taxa de reposição foi de 80% por hora.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro grupos experimentais (níveis de ea-Aa nas dietas) com cinco repetições (12 peixes por repetição/unidade experimental). Os peixes foram alimentados diariamente e manualmente até a saciedade aparente às 8:00, 11:00, 13:00 e 4:30 por 30 dias. As dietas foram pesadas diariamente antes da primeira e após a última alimentação para calcular a quantidade de dieta consumida.

O oxigênio dissolvido ( $6,10 \pm 0,70 \text{ mg.L}^{-1}$ ), temperatura ( $25,00 \pm 0,89 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e pH ( $7,20 \pm 0,217$ ) foram medidos diariamente com uma sonda multiparâmetro (U-50, Horiba, Minami-ku, Kyoto, Japão) antes da primeira alimentação. A amônia total ( $0,16 \pm 0,10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi medida semanalmente por meio de um kit comercial (Hach, Loveland, CO, EUA). Os aquários foram mantidos periodicamente por sifonagem e renovação de 20% do volume total do sistema. Todos os parâmetros de qualidade da água foram medidos em um aquário por tratamento do sistema de recirculação de água. Os valores dos parâmetros de qualidade da água encontrados neste estudo foram considerados adequados de acordo com [14].

Após o período experimental de alimentação, os peixes foram submetidos a jejum por 24 horas e anestesiados com benzocaína ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para pesagem. Os parâmetros de crescimento como ganho de peso (GP); taxa de crescimento específico (SGR); taxa de conversão alimentar (FCR) e taxa de eficiência de proteína (PER) foram avaliados de acordo com [15,16].

### 2.3. Análises histológicas

Peixes (dois por aquário; dez por tratamento;  $n = 40$ ) foram eutanasiados com benzocaína ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ) seguido de secção medular. O fígado e as vísceras foram pesados para determinar o índice hepatossomático (HSI) e o índice viscerossomático (VSI), que foram calculados sem o peso do fígado de acordo com [17]. Cortes transversais foram coletados da região medial do intestino, dissecados e lavados com paraformaldeído (10%) antes de serem fixados em paraformaldeído (10%) por 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período, fragmentos de intestino foram lavados em água corrente por 12 h e posteriormente imersos em etanol 70% até o processamento. As amostras foram desidratadas em séries graduadas de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) por 1 h em cada concentração e colocadas em uma solução contendo etanol 95% e resina básica (kit Leica Historesin Embedding) (1:1) por 4 h. Em seguida, essa solução foi retirada e as amostras foram colocadas em resina básica durante a noite a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  e incluídas em resina básica com endurecedor conforme protocolo do kit (kit Leica Historesin Embedding) e mantidas em estufa a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. O intestino foi seccionado com espessura de  $3 \text{ }\mu\text{m}$  em micrótomo eletrônico (MICRON HM 360). Os cortes foram corados com azul de toluidina e fucsina básica e analisados em microscópio de luz (BX 51, Olympus, Dinamarca) com registro de imagens no software Olympus DP2 - B5W. De cada seção do intestino, dois segmentos foram analisados. As variáveis morfológicas intestinais avaliadas foram perímetro das vilosidades, altura das vilosidades, espessura das vilosidades, profundidade das criptas e relação vilosidade:cripta de acordo com [18,19]. As medições de cada animal foram então calculadas para estimar um valor médio

para cada variável por tratamento (40 medições por parâmetro para cada tratamento).

O número de células calciformes por vilosidade foi contado e a área das vilosidades foi obtida de 4 vilosidades/3 tecidos por lâmina. As 12 medições foram então usadas para obter um número médio de células calciformes por peixe.

#### *2.4. Análise estatística*

Todos os dados foram submetidos a testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e as médias foram submetidas a uma análise de variância (ANOVA one-way). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey com um valor de  $p < 0,05$ .

#### *2.5. Declaração ética*

Todos os procedimentos envolvendo animais do presente estudo foram realizados seguindo os princípios éticos em experimentação animal e aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna, SP, Brasil (Protocolo nº 003/2016) e Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, SP, Brasil (Protocolo nº 1518230217).

### **3. Resultados**

Durante o período experimental, a taxa de sobrevivência foi de 100% para todos os tratamentos. Juvenis de tilápia do Nilo alimentados com uma

dieta de 0,1%, 0,25% e 0,5% de ea-Aa apresentaram maior GP ( $p = 0,001$ ) e SGR ( $p < 0,01$ ) e menor FCR ( $p < 0,01$ ) quando comparados aos peixes alimentados com dietas controle (Tabela 2). Porém o DFI, HSI e VSI não foram significativamente afetados pela suplementação de ea-Aa. Por outro lado, a tilápia do Nilo alimentada com a dieta de 0,1%, 0,25% e 0,5% de ea-Aa apresentaram o maior PER ( $p = 0,002$ ), em relação ao controle.

Peixes suplementados com ea-Aa apresentaram mudanças na morfologia intestinal, como vilosidades mais longas e aumento no perímetro das vilosidades (Figura 1). Para os peixes alimentados com 0,5 % de ea-Aa, o perímetro das vilosidades apresentou o maior valor e diferiu ( $p < 0,001$ ) do controle e dos tratamentos com 0,1 e 0,25 % (Tabela 3). A altura das vilosidades intestinais dos peixes alimentados com a dieta controle e 0,1 % foi inferior ( $p < 0,001$ ) em relação aos demais tratamentos, sendo maior valor para os peixes alimentados com 0,5 % de ea-Aa. As tilápias do Nilo alimentadas com dietas com 0,5% de ea-Aa exibiram a maior espessura de vilosidade, a qual diferiu ( $p < 0,001$ ) dos tratamentos de 0,1 e 0,25 % (Tabela 3), sendo a menor espessura encontrada no grupo controle. A profundidade de cripta dos peixes alimentados com 0,5 % de ea-Aa foi maior ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle e 0,1 %, mas não foi diferente do grupo que recebeu 0,25 %. Comparando o grupo 0,1 % ao controle, este também apresentou maior profundidade de cripta ( $p < 0,001$ ) (Tabela 3). A razão vilo:cripta foi maior ( $p < 0,001$ ) para os peixes que receberam 0,25 e 0,5 % de ea-Aa quando comparados aos peixes que receberam dieta controle e 0,1 %. O número de células calciformes foi maior ( $p < 0,001$ ) para os peixes que receberam 0,25 e 0,5 % de ea-Aa quando comparado ao grupo controle e 0,1

%. Na comparação entre o grupo 0,1 % e o controle, 0,1 % também teve aumento no número de células caliciformes (Tabela 3).

#### 4. Discussão

O extrato de ea-Aa apresentou benefícios potenciais para melhoria no desempenho produtivo da tilápia do Nilo, garantindo maior ganho de peso e crescimento, promovendo melhor conversão alimentar e eficiência proteica ao receber o suplemento por 30 dias. Os resultados do presente estudo corroboram os estudos anteriores que relataram maior crescimento e eficiência alimentar em frango de corte, suínos e da carpa comum que receberam uma dieta enriquecida com *Artemisia annua* [5–7]. No entanto, o presente estudo é o primeiro a descrever os benefícios como promotor de crescimento da administração do ea-Aa para a tilápia do Nilo. Por outro lado, Mbokane & Moyo [20] observaram que a eficiência alimentar e o desempenho do crescimento de bagre africano (*Clarias gariepinus*) não foram afetados pelo aditivo absinto (*Artemisia afra*), o que pode ser causada pelas diferentes composições da dieta, tipo de Artemísia, nível de dosagem [6] e espécie de peixe.

Em nosso estudo, a ração formulada suplementada com *A. annua* não afetou a gordura do fígado nos peixes, sem diferenças no HSI e o VSI entre todos os tratamentos. Da mesma forma, estudos realizados com peixes mostraram que as plantas geralmente não alteram a quantidade de gordura do fígado e vísceras [23–26]. Mudanças nas reservas de energia podem ser determinadas por meio desses índices, que podem indicar o balanço de energia, já que as reservas de energia em peixes podem estar no fígado, músculos e gordura das vísceras [21]. Na aquicultura, o fígado dos peixes



produzidos é muito gorduroso [22]. O excesso de gordura da ração não é usado como energia por peixes, em vez disso, é armazenado nos órgãos e tecidos, o que afeta negativamente a saúde dos peixes e reduz a utilização de ração [23]. As tilápias do Nilo alimentadas com a ração formulada contendo ea-Aa apresentaram maior ganho de peso e conversão alimentar sem mudanças nas reservas de energia. Portanto, o extrato de *A. annua* proporcionou uma melhor eficiência no aproveitamento energético da ração.

O expressivo efeito do ea-Aa observado no desempenho da tilápia do Nilo pode ser explicado pelo aumento da altura, perímetro, espessura e razão vilosidade:cripta das vilosidades intestinal dos animais suplementados. O intestino é o principal local de digestão e absorção dos peixes e desempenha um papel crucial no seu crescimento saudável [27]. Mudanças na morfologia intestinal, como vilosidades mais longas e aumento no perímetro das vilosidades, indicam uma maior capacidade de absorver nutrientes, bem como uma barreira mecânica melhorada no intestino de peixes [28]. Assim, o aumento na altura, espessura e perímetro das vilosidades se correlaciona com a absorção de nutrientes e pode explicar as melhores respostas no crescimento e na eficiência alimentar para tilápia do Nilo alimentada com níveis crescentes de ea-Aa. A inclusão dietética de 1 g/kg de *A. annua* também aumentou a altura das vilosidades e a relação entre a altura das vilosidades e a profundidade da cripta em 21,14% e 41,88%, melhorando a morfologia intestinal e o desempenho de crescimento em frangos de corte [29]. Portanto, o ea-Aa pode melhorar a morfologia intestinal da tilápia do Nilo, proporcionando melhores respostas no crescimento e na eficiência alimentar. Um grande número de

estudos demonstrou a importância do uso de aditivos alimentares para melhorar as taxas de crescimento e a saúde geral dos animais aquáticos [30].

As células caliciformes, presentes ao longo de todo o intestino, são responsáveis pela síntese e secreção da camada protetora de muco que recobre a superfície do epitélio e atua como a primeira linha de defesa [31]. A mucosa intestinal fornece uma barreira fisiológica e imunológica a uma ampla gama de microrganismos e substâncias estranhas [28]. Todos os níveis de suplementação de ea-Aa aumentaram o número de células caliciformes na tilápia do Nilo quando comparada a peixes que não receberam ea-Aa. A abundância de células caliciformes corroboram as pesquisas anteriores que mostraram o impacto do uso de imunoestimulantes naturais na função do intestino em animais aquáticos [30,32–34]. O trato gastrointestinal é uma porta de entrada para uma série de patógenos [35] e o aumento de células caliciformes podem, portanto, fornecer uma resistência elevada à patogênese intestinal [32] contribuindo para a saúde geral e permitindo melhores desempenhos produtivos dos peixes.

Em conclusão, este estudo mostra que a inclusão de ea-Aa na dieta de tilápia do Nilo aumenta o número de células caliciformes no intestino, portanto, aumenta a resistência a patógenos intestinal e melhora a morfologia intestinal, resultando em melhor desempenho animal. Assim, a formulação de ração contendo ea-Aa para peixes devem ser consideradas para melhorar a saúde do intestino e, conseqüentemente, a taxa de crescimento dos peixes fornecendo ao setor produtivo uma alternativa ao uso de substâncias sintéticas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Piscicultura Polettini pela doação dos peixes para o presente estudo. Agradecemos também aos técnicos de laboratório Gino Vitorio Zambon, Marisa Pereira Carvalho e Ana Lucia Marigo pelo apoio e assistência durante o experimento. Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / CAPES, Brasil. As atividades do presente estudo foram desenvolvidas em parceria com o projeto “BRS Aqua” uma parceria entre o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, Embrapa e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e apoio do Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia e Fundação Eliseu Alves.

## References

- [1] S.H. Hoseinifar, Y.Z. Sun, Z. Zhou, H. Van Doan, S.J. Davies, R. Harikrishnan, Boosting Immune Function and Disease Bio-Control Through Environment-Friendly and Sustainable Approaches in Finfish Aquaculture: Herbal Therapy Scenarios, *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 0 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1731420>.
- [2] C. Bulfon, D. Volpatti, M. Galeotti, Current research on the use of plant-derived products in farmed fish, *Aquac. Res.* 46 (2015) 513–551. <https://doi.org/10.1111/are.12238>.
- [3] A.M. Haygood, R. Jha, Strategies to modulate the intestinal microbiota of Tilapia (*Oreochromis* sp.) in aquaculture: a review, *Rev. Aquac.* 10 (2018) 320–333. <https://doi.org/10.1111/raq.12162>.
- [4] A. Hesabi Nameghi, O. Edalatian, R. Bakhshalinejad, Effects of a blend of thyme, peppermint and eucalyptus essential oils on growth performance, serum lipid and hepatic enzyme indices, immune response and ileal morphology and microflora in broilers, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 103 (2019) 1388–1398. <https://doi.org/10.1111/jpn.13122>.
- [5] S. Guo, J. Ma, Y. Xing, Y. Xu, X. Jin, S. Yan, B. Shi, *Artemisia annua* L. aqueous extract as an alternative to antibiotics improving growth performance and antioxidant function in broilers, *Ital. J. Anim. Sci.* 19 (2020) 399–409. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1745696>.
- [6] Y. Niu, J.T. He, Y.W. Zhao, Z.D. Gan, M.M. Shen, L.L. Zhang, T. Wang, Dietary enzymatically treated *Artemisia annua* L. supplementation improved growth performance and intestinal antioxidant capacity of weaned piglets, *Livest. Sci.* 232 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.103937>.
- [7] I. Sarhadi, E. Alizadeh, E. Ahmadifar, H. Adineh, M.A.O. Dawood, Skin mucosal, serum immunity and antioxidant capacity of common carp (*Cyprinus carpio*) fed artemisia (*Artemisia annua*), *Ann. Anim. Sci.* 1 (2020). <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0011>.
- [8] E.A. Brisibe, U.E. Umoren, F. Brisibe, P.M. Magalhães, J.F.S. Ferreira, D. Luthria, X. Wu, R.L. Prior, Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L., *Food Chem.* 115 (2009) 1240–1246. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.033>.
- [9] R.W. Bussmann, G. Malca-García, A. Glenn, D. Sharon, G. Chait, D. Díaz, K. Pourmand, B. Jonat, S. Somogy, G. Guardado, C. Aguirre, R. Chan, K. Meyer, A. Kuhlman, A. Townesmith, J. Effio-Carbajal, F. Frías-Fernandez, M. Benito, Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies, *J. Ethnopharmacol.* 132 (2010) 101–108.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.048>.

- [10] M. Sakai, Current research status of fish immunostimulants, *Aquaculture*. 172 (1999) 63–92. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00436-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00436-0).
- [11] FAO, *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action.*, Rome, 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- [12] M.P. Soares, I.L. Cardoso, M.M. Ishikawa, A. da S.S. de Oliveira, A. Sartoratto, C.M. Jonsson, S.C. do N. de Queiroz, M.C.T. Duarte, F.T. Rantin, F.G. Sampaio, Effects of *Artemisia annua* alcohol extract on physiological and innate immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to improve health status, *Fish Shellfish Immunol.* 105 (2020) 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.035>.
- [13] I.G. Guimarães, L.E. Pezzato, M.M. Barros, L. Tachibana, Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia, *J. World Aquac. Soc.* 39 (2008) 781–789. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00214.x>.
- [14] N. Ibrahim, G. El Naggat, Water quality, fish production and economics of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and African catfish, *Clarias gariepinus*, monoculture and polycultures, *J. World Aquac. Soc.* 41 (2010) 574–582. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00397.x>.
- [15] Erfanullah, A.K. Jafri, Growth, feed conversion, body composition and nutrient retention efficiencies in fingerling catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), fed different sources of dietary carbohydrate, *Aquac. Res.* 30 (1999) 43–49. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00298.x>.
- [16] N. Mohd Faudzi, A.S.K. Yong, R. Shapawi, S. Senoo, A. Biswas, K. Takii, Soy protein concentrate as an alternative in replacement of fish meal in the feeds of hybrid grouper, brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) × giant grouper (*E. lanceolatus*) juvenile, *Aquac. Res.* 49 (2018) 431–441. <https://doi.org/10.1111/are.13474>.
- [17] Y.H. Wang, F. Yan, W.B. Zhang, G. Ye, Y.Y. Zheng, X.H. Zhang, F.Y. Shao, An investigation of vitamin B12 deficiency in elderly inpatients in neurology department, *Neurosci. Bull.* 25 (2009) 209–215. <https://doi.org/10.1007/s12264-009-0224-9>.
- [18] G.S. Pryor, J.B. Royes, F.A. Chapman, R.D. Miles, Mannan oligosaccharides in Fish Nutrition: Effects of Dietary Supplementation on Growth and Gastrointestinal Villi Structure in Gulf of Mexico Sturgeon, *N. Am. J. Aquac.* 65 (2003) 106–111. [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(2003\)65<106:mifneo>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(2003)65<106:mifneo>2.0.co;2).
- [19] H. Hisano, M.P. Soares, F.G. Luiggi, A.C. Arena, Dietary  $\beta$ -glucans and mannan oligosaccharides improve growth performance and intestinal

- morphology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), *Aquac. Int.* 26 (2018) 213–223. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0210-6>.
- [20] E.M. Mbokane, N.A.G. Moyo, Effect of dietary *Artemisia afra* on growth, some innate immunological parameters in *Clarias gariepinus* challenged with *Aeromonas hydrophila*, *Aquac. Int.* 28 (2020) 539–553. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00479-y>.
- [21] M. Jobling, Nutrient partitioning and the influence of feed composition on body composition, in: Houlihan D, Boujard T, Jobling M *Food Intake Fish.*, Blackwell, Oxford, 2001: pp. 354–375.
- [22] Roberts R. J., *Fish Pathology*, 3rd Ed, WB Saunders Toronto, 2001.
- [23] E. Yilmaz, D. Çoban, B. Kırım, M. Güler, Effects of Extracts of Feed Additives Including Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and Aloe Vera (*Aloe barbadensis*) on the Growth Performance and Feed Utility of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Turkish J. Agric. - Food Sci. Technol.* 7 (2019) 866. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i6.866-870.2438>.
- [24] S.H. Cho, Effects of Putative Growth or Health-Enhancing Dietary Additives on Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Performance, *J. World Aquac. Soc.* 42 (2011) 90–95. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00447.x>.
- [25] N.N. Gabriel, J. Qiang, J. He, X.Y. Ma, M.D. Kpundeh, P. Xu, Dietary Aloe vera supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT), *Fish Shellfish Immunol.* 44 (2015) 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.002>.
- [26] J. Xie, B. Liu, Q. Zhou, Y. Su, Y. He, L. Pan, X. Ge, P. Xu, Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. Jian, *Aquaculture.* 281 (2008) 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.038>.
- [27] N. Pirarat, K. Pinpimai, M. Endo, T. Katagiri, A. Ponpornpisit, N. Chansue, M. Maita, Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Res. Vet. Sci.* 91 (2011) e92–e97. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.014>.
- [28] H. Zhu, H. Liu, J. Yan, R. Wang, L. Liu, Effect of yeast polysaccharide on some hematologic parameter and gut morphology in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Fish Physiol. Biochem.* 38 (2012) 1441–1447. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9631-3>.
- [29] Z.H. Song, K. Cheng, X.C. Zheng, H. Ahmad, L.L. Zhang, T. Wang, Effects of dietary supplementation with enzymatically treated *Artemisia*

- annua* on growth performance, intestinal morphology, digestive enzyme activities, immunity, and antioxidant capacity of heat-stressed broilers, *Poult. Sci.* 97 (2017) 430–437. <https://doi.org/10.3382/ps/pex312>.
- [30] M.A.O. Dawood, Nutritional immunity of fish intestines: important insights for sustainable aquaculture, *Rev. Aquac.* 13 (2021) 642–663. <https://doi.org/10.1111/raq.12492>.
- [31] R. Cerezuela, M. Fumanal, S.T. Tapia-Paniagua, J. Meseguer, M.Á. Morinigo, M.Á. Esteban, Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae, *Cell Tissue Res.* 350 (2012) 477–489. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1495-4>.
- [32] B.T. Standen, M.D. Rawling, S.J. Davies, M. Castex, A. Foey, G. Gioacchini, O. Carnevali, D.L. Merrifield, Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Fish Shellfish Immunol.* 35 (2013) 1097–1104. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.018>.
- [33] B.T. Standen, D.L. Peggs, M.D. Rawling, A. Foey, S.J. Davies, G.A. Santos, D.L. Merrifield, Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Fish Shellfish Immunol.* 49 (2016) 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.037>.
- [34] F.K.A. Kuebutornye, Z. Wang, Y. Lu, E.D. Abarike, M.E. Sakyi, Y. Li, C.X. Xie, V. Hlordzi, Effects of three host-associated *Bacillus* species on mucosal immunity and gut health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection, *Fish Shellfish Immunol.* 97 (2020) 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.046>.
- [35] E. Ringø, R. Myklebust, T.M. Mayhew, R.E. Olsen, Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry, *Aquaculture.* 268 (2007) 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.047>.
- [36] I.G. Guimarães, L.E. Pezzato, M.M. Barros, Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Aquac. Nutr.* 14 (2008) 396–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00540.x>.
- [37] AOAC, Official Methods of Analysis, 17 ed., Assoc. Off. Anal. Chem. Washington, DC,. (2000) 97.

Tabela 1. Formulação e composição química das dietas experimentais.

Ingrediente	Extrato de <i>A. annua</i> (%)			
	0,00	0,10	0,25	0,50
Farelo de soja (45%) <sup>1</sup>	59,00	58,90	58,75	58,50
Farelo de milho <sup>2</sup>	13,2	13,1	12,95	12,70
Farelo de trigo <sup>1</sup>	19,30	19,30	19,30	19,30
Óleo de soja	1,20	1,20	1,20	1,20
Fosfato dicálcico	3,46	3,46	3,46	3,46
Aglutinante	1,98	1,98	1,98	1,98
Bicarbonato de Sódio	0,25	0,25	0,25	0,25
DL-Metionina (99%)	0,44	0,44	0,44	0,44
L-Isoleucina	0,25	0,25	0,25	0,25
L-Histidina	0,16	0,16	0,16	0,16
L-Valina	0,04	0,04	0,04	0,04
Cloreto de sódio (NaCl)	0,10	0,10	0,10	0,10
Vitamina e mineral premix <sup>3</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT (butil hidroxitolueno)	0,02	0,02	0,02	0,02
Total	100	100	100	100
Níveis de nutrientes calculados <sup>4</sup>				
Proteína digestível (%)	31,08			
Energia digestível (Mcal/kg)	3,0406			
Cálcio (%)	1,07			
Fósforo disponível (%)	0,73			
Composição analisada <sup>5</sup>				
<i>Extrato de Artemisia annua</i> (%)	0,00	0,10	0,25	0,50
Proteína bruta (%)	31,86	31,39	32,72	32,40
Extrato etéreo (%)	2,39	3,09	3,15	3,03
Fibra bruta (%)	25,03	23,31	26,32	25,39
Matéria seca (%)	90,39	93,56	92,57	90,16
Matéria orgânica (%)	91,53	91,49	91,60	91,49
Carboidrato total (%)	56,79	57,01	55,73	54,06
Carboidratos não fibrosos (%)	28,76	28,70	29,41	28,67
Cinza (%)	7,64	8,07	8,00	8,05

<sup>1</sup> De acordo com [36], como g kg<sup>-1</sup> de matéria seca: farelo de soja (19,3 MJ kg<sup>-1</sup> de energia bruta, 512,1 de proteína bruta, 14,8 de lipídios totais, 71,2 de fibra bruta, 74,4 gramas), subprodutos de aves (20,4 MJ kg<sup>-1</sup> energia bruta, 627,9 proteína bruta, 171,8 lipídios totais, 183,2 gramas) e farinha de glúten de milho (20,6 MJ kg<sup>-1</sup> de energia bruta, 700,7 proteína bruta, 94,8 lipídio bruto, 8,3 fibra bruta, 17,0 cinza). <sup>2</sup> De acordo com [13], como g kg<sup>-1</sup> de matéria seca: milho (16,9 MJ kg<sup>-1</sup> de energia bruta, 72,1 de proteína bruta, 42,4 lipídios totais, 20,0 de fibra bruta, 12,0 gramas), arroz (15,5 MJ kg<sup>-1</sup> de energia bruta, 82,1 proteína bruta, 82,6 lipídios totais, 7,50 fibra bruta, 7,80 cinza). <sup>3</sup> Composição da pré-mistura de vitaminas e minerais (Vaccinar, Belo Horizonte, MG, Brasil) kg dieta<sup>-1</sup>.117: vitamina A: 500.000 UI, vitamina D3, 250.000 UI, vitamina E 5.000 mg, vitamina K3, 500 mg, vitamina B1 1.000 mg, vitamina B2: 1.000 mg, vitamina B6: 1.000 mg, vitamina B12: 2.000 mg, niacina: 2.500, ácido fólico: 500 mg, biotina: 10 mg, vitamina C 10.000 mg, colina: 100.000 mg, Inositol: 1.000 mg, selênio: 30 mg, ferro: 5.000 mg, cobre: 1.000 mg, manganês: 5.000 mg, zinco: 9.000 mg, cobalto: 50 mg, iodo: 200 mg. <sup>4</sup> Níveis de nutrientes calculados de acordo com os níveis de nutrientes. <sup>5</sup> Valores determinados de acordo com as metodologias descritas por [37].



Tabela 2. Parâmetros de desempenho de tilápia do Nilo alimentada com dietas com níveis graduados do extrato alcoólico de *Artemisia annua* (%).

Parâmetros	Extrato de <i>Artemisia annua</i> (%)			
	0,00	0,10	0,25	0,50
IW (g)	24,20±0,17 <sup>a</sup>	24,41±0,30 <sup>a</sup>	24,36±0,17 <sup>a</sup>	24,39 ± 0,35 <sup>a</sup>
WG (g)	35,78 ± 1,97 <sup>b</sup>	43,21 ± 4,24 <sup>a</sup>	43,04 ± 3,00 <sup>a</sup>	44,04 ± 1,80 <sup>a</sup>
SGR	4,01 ± 0,03 <sup>b</sup>	4,15 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,13 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,15 ± 0,03 <sup>a</sup>
DFI (g)	59,93 ± 1,56 <sup>a</sup>	61,26 ± 0,89 <sup>a</sup>	61,27 ± 0,65 <sup>a</sup>	61,30 ± 0,98 <sup>a</sup>
FCR	2,04 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,21 <sup>b</sup>	1,55 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,49 ± 0,04 <sup>b</sup>
PER	1,93 ± 0,12 <sup>b</sup>	2,27 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,27 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,06 <sup>a</sup>
HSI (%)	1,59 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,56 ± 0,53 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,45 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,51 <sup>a</sup>
VSI (%)	7,45 ± 3,71 <sup>a</sup>	7,21 ± 3,54 <sup>a</sup>	7,34 ± 3,00 <sup>a</sup>	7,34 ± 3,26 <sup>a</sup>

Os valores são média ± desvio padrão. Médias na mesma linha com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes para  $p < 0,05$ . Peso inicial (IW), ganho de peso (WG), taxa de crescimento específico (SGR), ingestão diária de ração (DFI), taxa de conversão alimentar (FCR), taxa de eficiência proteica (PER), índice hepatossomático (HSI) e índice viscerossomático (VSI).

Tabela 3. Variáveis morfológicas intestinais de tilápia do Nilo alimentada com dietas com níveis graduados de extrato alcoólico de *Artemisia annua* (%).

Parâmetros	Extrato de <i>Artemisia annua</i> (%)			
	0,00	0,10	0,25	0,50
Perímetro do vilo (µm)	869,73±127,96 <sup>c</sup>	1092,57±172,95 <sup>b</sup>	1102,51±131,75 <sup>b</sup>	1202,94±95,17 <sup>a</sup>
Altura do vilo (µm)	295,96±92,82 <sup>c</sup>	313,80±41,13 <sup>c</sup>	368,26±57,50 <sup>b</sup>	452,55±50,05 <sup>a</sup>
Espessura do vilo (µm)	112,57±10,45 <sup>c</sup>	132,68±14,14 <sup>b</sup>	138,98±13,85 <sup>b</sup>	147,93±8,49 <sup>a</sup>
Profundidade da cripta (µm)	40,20±3,94 <sup>c</sup>	44,37±4,74 <sup>b</sup>	45,34±6,75 <sup>ab</sup>	47,48±5,31 <sup>a</sup>
Razão vilo:cripta	6,62±2,14 <sup>b</sup>	7,14±1,18 <sup>b</sup>	9,25±1,74 <sup>a</sup>	9,64±1,47 <sup>a</sup>
Número de células caliciformes	10,04±3,73 <sup>c</sup>	18,07±3,93 <sup>b</sup>	20,87±2,38 <sup>a</sup>	20,07±2,07 <sup>a</sup>

Os valores são média ± DP. Médias na mesma linha com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes para p <0,05.

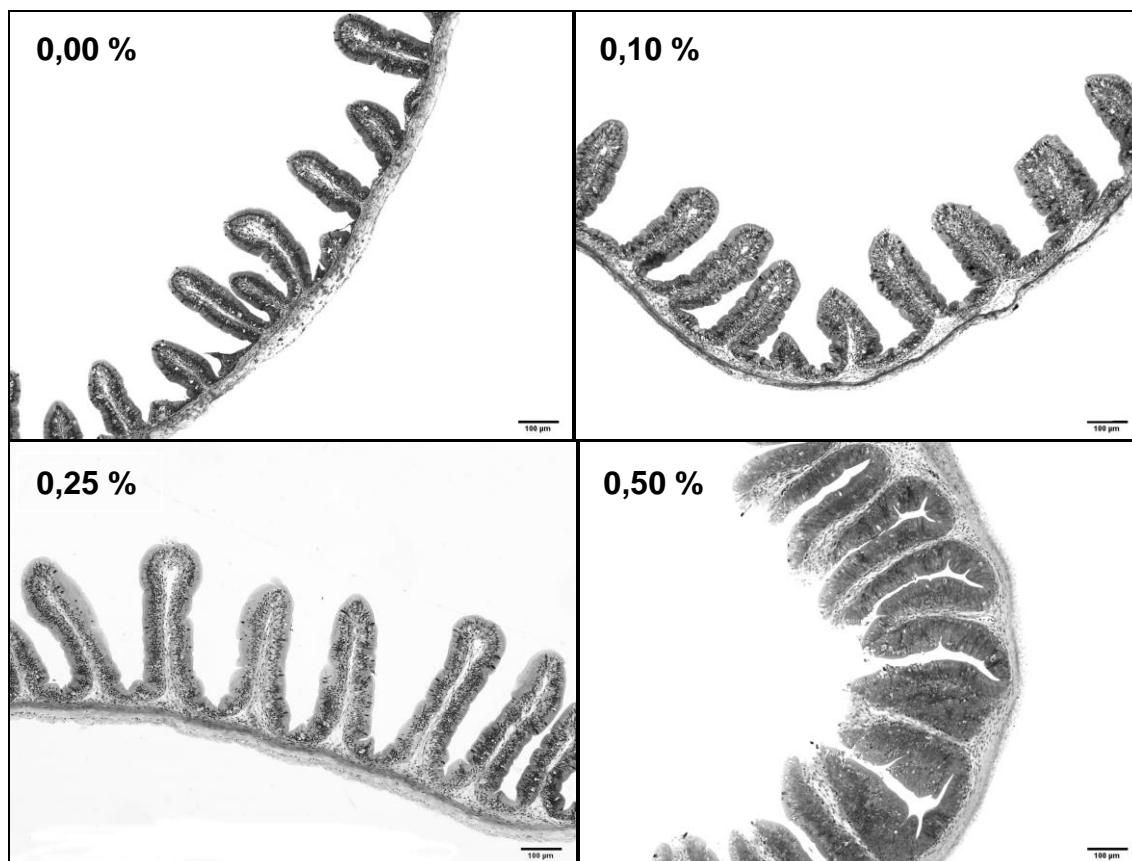
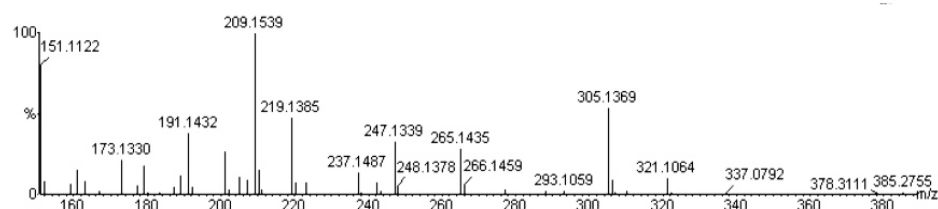
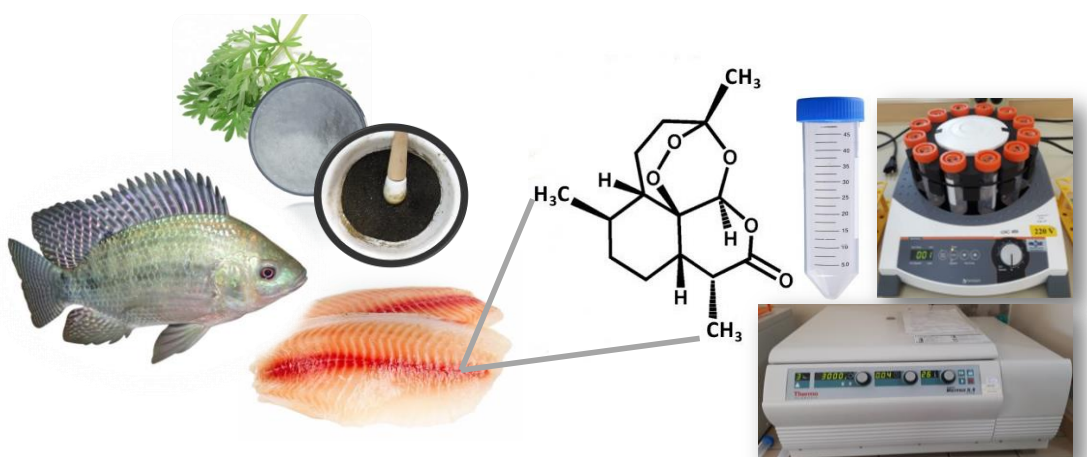


Figura 1. Cortes histológicos do intestino de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de extrato alcoólico de *Artemisia annua* por 30 dias. Barra de escala: 100 µm.

## CAPÍTULO V

---

**Desenvolvimento de método para determinação de artemisinina em músculo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por QuEChERS modificado combinado com microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução**



Submetido para Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.

## Resumo

O extrato alcoólico de *Artemisia annua* é um suplemento eficiente na mitigação dos efeitos de condições estressantes na aquicultura, pois melhora a saúde e a resistência dos peixes de viveiro. A fim de avaliar o potencial de acúmulo de ingredientes ativos em peixes, métodos analíticos sensíveis e confiáveis devem estar disponíveis. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico para quantificar artemisinina em músculos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) baseado em QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) modificado seguido de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Ultrassom (UA-DLLME) e cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a eletrospray espectrometria de massa de ionização/quadrupolo-tempo de voo (UPLC-ESI-QToF). Boa acurácia (> 70,0%), precisão intermediária (<15,8%) e repetibilidade (<13,8%) foram obtidas pelo método desenvolvido. A linearidade foi satisfatória com coeficiente de determinação  $R^2 > 0,99$ . Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram 0,05 e 0,25  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Efeitos de baixa matriz foram observados (-12%) e foram desconsiderados. Este método tem baixo consumo de solvente e reagentes e pode ser aplicado para obter resultados confiáveis de resíduos de artemisinina no músculo da tilápia.

**Palavras-chave:** Medicamentos veterinários; Química verde; Resíduos em peixes; Medicamentos fitoterápicos; *Artemisia annua*; Aquicultura

## 1. Introdução

A aquicultura oferece uma fonte promissora de proteínas saudáveis para consumo humano (FAO, 2020). O aumento da produção de peixes para atender às necessidades dos consumidores vem com a necessidade de um maior controle, como o fornecimento de dietas balanceadas e melhores condições de saúde para os peixes das pisciculturas. O aumento do risco de resistência antimicrobiana na produção animal tem justificado um maior interesse em peixes cultivados com menos substâncias químicas sintéticas, nos quais o uso de antibióticos e outros medicamentos veterinários para controle de patógenos é evitado (Hoseinifar et al., 2020). Nesse sentido, tem sido sugerido que a administração de aditivos naturais, como princípios ativos extraídos de plantas, pode resultar em imunomodulação e ser uma alternativa para melhorar o sistema imunológico de animais de cultivo, reduzindo problemas de estresse e o aparecimento de doenças (Hoseinifar et al., 2020; Ringø et al., 2010). Além disso, pode ser atraente para consumidores atentos à qualidade dos alimentos, que optam por consumir produtos sem terapêutica sintética (Limbu, Zhou, Sun, Zhang, & Du, 2018).

Muitos extratos e compostos ativos de plantas medicinais são altamente eficazes contra parasitas de peixes (Doan, Soltani, Ingelbrecht, & Soltani, 2020; Hoseinifar et al., 2020; Shen et al., 2018). *Artemisia annua* é uma planta medicinal conhecida por sua alta eficiência e baixa toxicidade (Bhakuni, Jain, Sharma, & Kumar, 2001; Tayebe, Mehrnaz, Khosro, & Tahere, 2012; Wu, Ling, Song, Chen, & Wang, 2016). Artemisinina (ART), é o principal componente responsável pelo efeito terapêutico (Van Nieuwerburgh et al., 2006) e seu uso foi recomendado pela Organização Mundial de Saúde como parte de terapias

combinadas contra a malária (WHO, 2014). Além disso, *A. annua* é um suplemento eficiente em mitigar os efeitos de condições estressantes na aquicultura, ao mesmo tempo que melhora a saúde e a resistência dos peixes cultivados. Recentemente foi demonstrado que o extrato alcoólico de *A. annua*, contendo artemisinina, pode modular o sistema imunológico inato da tilápia do Nilo, mitigando os efeitos do estresse e aumentando a resistência dos peixes à infecção bacteriana (Soares et al., 2020). Além disso, tem um potencial considerável como um imunoestimulante natural e suplemento promotor de crescimento para a aquicultura da carpa comum (*Cyprinus carpio*) (Sarhadi, Alizadeh, Ahmadifar, Adineh, & Dawood, 2020).

Os medicamentos fitoterápicos surgiram recentemente no âmbito das medicações complementares e alternativas porque têm custo relativamente menor e maior segurança (Yun et al., 2016). Nesse sentido, o ART é um agente alternativo promissor para melhorar a produção e o controle de doenças parasitárias em peixes de cultivo. No entanto, a farmacocinética e a eliminação de resíduos de ART em peixes ainda são desconhecidas. Assim, o estudo da farmacocinética do ART pode ter resultados relevantes para o uso deste composto como um imunomodulador de peixes de cultivo destinados ao consumo humano. Estudos avaliando a toxicidade da ART mostram que sua eliminação rápida após a ingestão oral representa uma via de administração relativamente segura, mas a disponibilidade em longo prazo causa toxicidade (Efferth & Kaina, 2010). Portanto, deve-se verificar se a ART gera resíduos que podem prejudicar o consumidor.

Para se obter um produto compatível com a legislação e seguro para consumo humano, o tempo mínimo necessário para a depleção do fármaco em

músculo de peixe medicado deve atender ao Limite Máximo de Resíduos (LMR) (EC, 2009). Nesse sentido, enquanto métodos analíticos podem ser usados para monitorar resíduos de fármacos em alimentos, em peixes a matriz é complexa e os analitos estão presentes em baixa concentração. Portanto, é necessário preparar amostras adequadas para pré-concentrar a ART e remover compostos interferentes, como proteínas e lipídios. No desenvolvimento de métodos de preparação de amostras, esforços têm sido direcionados para procedimentos que não agridam o meio ambiente, com consumo mínimo de produtos químicos e baixa geração de resíduos, como microextração líquido-líquido dispersa assistida por ultrassom (UA-DLLME) e QuEChERS modificado (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, ou seja, rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro).

A grande maioria dos instrumentos analíticos pode lidar apenas com amostras líquidas. Portanto, antes de aplicar um procedimento de microextração, os analitos devem ser transferidos das amostras de filé de peixe bruto para uma fase aquosa. Várias abordagens de extração têm sido usadas para esse fim, às vezes em conjunto com a limpeza de amostra (Diuzheva et al., 2020). Essas técnicas envolvem extração com água ou solvente orgânico, como o método QuEChERS (Anastassiades, Lehotay, Štajnbaher, & Schenck, 2003). Este método é baseado em três etapas principais: 1) extração com acetonitrila, que permite a precipitação de proteínas e a extração de uma pequena quantidade de lipídios da amostra, sendo também um solvente com ampla capacidade de extração de compostos com polaridades variadas; 2) adição de sais (sulfato de magnésio e cloreto de sódio), que promove o efeito de salting out, diminuindo a solubilidade dos analitos na fase aquosa e a



quantidade de água na fase orgânica, promovendo a extração de compostos para acetonitrila; após a mistura e centrifugação, o sobrenadante é removido e transferido para outro tubo de centrífuga para a próxima etapa; 3) limpeza, também chamada de extração dispersiva em fase sólida (d-SPE), que visa remover a água residual e possíveis interferências ainda presentes no sobrenadante. Em geral, o sorvente de amina secundária primária (PSA) é usado, o que remove as interferências da matriz. Existem três métodos QuEChERS oficiais: o QuEChERS original, o acetato QuEChERS e o citrato QuEChERS (Arroyo-Manzanares, García-Campaña, & Gámiz-Gracia, 2013; Qin et al., 2016). A extração por DLLME (Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction), proposta em 2006 por Rezaee et al. (Rezaee et al., 2006) ocorre pelo processo de partição dos analitos entre as duas fases do líquido imiscível, regido pela polaridade. Consiste na rápida injeção de solventes de dispersão e extração na amostra aquosa contendo os analitos, formando uma dispersão de microgotículas de solvente orgânico na fase aquosa (Martins et al., 2012). Em seguida, a dispersão é centrifugada e a fase orgânica é transferida para injeção no sistema cromatográfico. Tanto o QuEChERS quanto o DLLME foram usados para determinar a concentração de antibióticos em peixes (Lombardo-Agüí, García-Campaña, Cruces-Blanco, & Gámiz-Gracia, 2015; Marques, Paschoal, Barone, Cyrino, & Rath, 2018; Shiroma, Queiroz, Jonsson, & Bottoli, 2020), mas, pelo que sabemos, ainda não existe uma metodologia padronizada para avaliar a presença de artemisinina em filés de peixe.

Portanto, técnicas de preparação de amostras baseadas em QuEChERS e microextração líquida dispersiva assistida por ultrassom (UA-DLLME) foram

avaliadas para a determinação de Artemisinina no músculo de tilápia por LC-MS / MS. O método desenvolvido foi validado seguindo as orientações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) e a Diretriz da Comunidade Europeia para avaliação do potencial acúmulo de resíduos de medicamentos.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Reagentes e aparelhos*

O padrão certificado de ART (pureza  $\geq 98\%$ ) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). A Tabela 1 mostra a estrutura química e propriedades físico-químicas, juntamente com o  $pK_a$ ,  $\log K_{ow}$ , solubilidade em água e ponto de fusão de ART. O ácido fórmico (96%), o sulfato de magnésio anidro ( $MgSO_4$ ) e o sorvente bondesil C18 (tamanho de partícula de 40  $\mu m$ ) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A acetonitrila (grau HPLC) e os solventes de tolueno foram obtidos na Scharlau (Sentmenat, BCN, Espanha). Água ultrapura foi obtida do sistema de purificação Milli-Q® Advantage A10 (Millipore, Burlington, MA, EUA). Um aparelho de equilíbrio BG4400 Gehaka (São Paulo, SP, Brasil), um ultrassom transônico 660 / H Elma (Singen, BW, Alemanha), um misturador centrífugo Multifuge 3L-R Heraeus Thermo Fisher (Waltham, MA, EUA) e um Multi Reax Heidolph (Schwabach, BAR, Germany) foi utilizado para o desenvolvimento do método.

### *2.2. Soluções padrão*

A solução padrão estoque de ART a uma concentração de 1000  $\mu g mL^{-1}$  foi preparada dissolvendo uma quantidade conhecida do analito em acetonitrila

e armazenada no escuro a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Um padrão de trabalho de ART ( $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi preparado por dissolução em acetonitrila, e diluições apropriadas das soluções estoque foram mantidas refrigeradas ( $T < 6\ ^{\circ}\text{C}$ ). As soluções utilizadas para a obtenção das curvas analíticas foram preparadas por diluição adequada das soluções de trabalho na fase móvel (acetonitrila: ácido fórmico aquoso 0,1% 70:30 v / v) em concentrações variando de 0,025 a  $0,75\ \mu\text{g mL}^{-1}$ . As soluções foram preparadas diariamente.

### 2.3. Condições LC-MS / MS

Um sistema UPLC-Q-TOF que compreende um sistema Acquity UPLC acoplado a um espectrômetro de massa de tempo de voo ortogonal quadrupolo híbrido (Q-TOF) (espectrômetro de massa SYNAPT HDMS Q-TOF) com ionização de fonte de eletrospray (ESI) em modo positivo (Waters Corp., Milford, MA, EUA). Os parâmetros de otimização estabelecidos para o sistema ESI-Q-TOF foram tensão capilar: 3 kV, tensão do detector: 2000 kV, tensão do cone da amostra: 30,0 V, tensão do cone de extração: 5,0 V, temperatura da fonte:  $110\ ^{\circ}\text{C}$ , temperatura do gás de dessolvatação:  $400\ ^{\circ}\text{C}$ , fluxo de gás nitrogênio no cone:  $20\ \text{L h}^{-1}$  e fluxo de dessolvatação:  $450\ \text{L h}^{-1}$ .

O software MassLynx (versão 4.1) foi empregado para aquisição de dados. A separação dos analitos foi realizada em coluna analítica BEH  $\text{C}_{18}$  ( $100\ \text{mm} \times 2,1\ \text{mm}$ ,  $1,7\ \mu\text{m}$ ) da Waters (Massachusetts, EUA) e modo de eluição gradiente com fase móvel composta por ácido fórmico aquoso (0,1%) e acetonitrila, em fluxo taxa  $0,225\ \text{mL min}^{-1}$ . O volume de injeção e o tempo de execução foram de  $10\ \mu\text{L}$  e 5 min, respectivamente.

A ART foi confirmada pela massa precisa do íon molecular protonado, bem como pela consideração de fragmentos para obter os pontos de identificação (IPs) de acordo com a Decisão da Comissão 2002/657/CE (Decisão da Comissão, 2002).

#### 2.4. Preparação de amostra

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi usada para desenvolver o método. Os peixes experimentais foram estocados em aquários (300 L). Os peixes foram coletados, eutanasiados por imersão em solução de benzocaína (100 mg.L<sup>-1</sup>) seguida de secção medular. O músculo foi coletado, homogeneizado em um Robot Coupe Blixer 3, acondicionado em sacos plásticos rotulados e armazenado congelado a -20 °C. Para a preparação da amostra, foi usado o QuEChERS modificado seguido por uma microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (UA-DLLME). Um grama da amostra foi pesado em tubos de polipropileno (50 mL). Foram adicionados 5 mL de extrator dispersor de acetonitrila e 2,0 g de sulfato de magnésio. O tubo foi agitado em vórtex por 2 minutos e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. A etapa seguinte foi uma limpeza com adição de 50 mg de C<sub>18</sub> em 2 mL de sobrenadante da fase orgânica. O tubo foi novamente agitado em vórtex por 2 minutos e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. Um 1,0 mL do sobrenadante contendo acetonitrila e ART foi pipetado e transferido para outro tubo. O solvente foi completamente evaporado sob uma corrente de nitrogênio e dissolvido em 1,0 mL de água ultrapura. O procedimento UA-DLLME subsequente foi realizado por uma injeção rápida de 750 µL de acetonitrila: tolueno (75:25 v/v) no tubo de ensaio com uma seringa de 1000 µL (estaque

ao gás, Hamilton, NV). Após a extração, a separação de fases foi realizada por centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. A fase sedimentada foi totalmente transferida para outro tubo de ensaio. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e a fase sedimentada coletada foi adicionada ao mesmo tubo de ensaio e evaporada sob um fluxo suave de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 1 mL da fase móvel filtrado com filtros de náilon de 0,22  $\mu\text{m}$  e injetado no sistema UPLC-QTOF.

### *2.5. Método de Validação*

Desenvolvimento e validação do método analítico foram realizadas com amostras de tilápia (amostras em branco) livres de ART. O procedimento de validação foi realizado para determinar seletividade, linearidade, limite de quantificação (LOQ), acurácia (recuperação), repetibilidade (RSDr), precisão intermediária (RSDR) e efeito de matriz com base nos parâmetros e critérios estabelecidos no documento SANTE 11813/2017.

#### *2.5.1. Seletividade*

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas das amostras em branco com os picos gerados pelo analito no cromatograma da amostra enriquecida a 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### *2.5.2. Linearidade*

As curvas analíticas foram feitas na matriz e emparelhadas com soluções utilizando seis diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,125, 0,25, 0,5 e 0,75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de ART, que foi adicionado aos extratos após o procedimento de

extração das amostras de tilápia. Os ensaios foram replicados três vezes para cada ponto de concentração, considerando desvio padrão relativo (RSD%) inferior a 20%. A linearidade foi estimada por meio da análise de regressão linear pelo método de regressão dos mínimos quadrados e os intervalos lineares foram estabelecidos para o ART, bem como o coeficiente de determinação ( $r^2 > 0,99$ ).

#### 2.5.3. Limite de quantificação (LOQ)

O LOQ foi tomado como o primeiro nível da curva analítica ( $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), que foi medido com precisão aceitável ( $\text{RSD} \leq 20\%$ ,  $n = 5$ ).

#### 2.5.4. Precisão e repetibilidade ( $\text{RSD}_r$ )

A precisão foi determinada como a recuperação percentual de cinco repetições em dois níveis de adição ( $0,25$  e  $1,25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). A recuperação foi considerada adequada quando os valores estavam dentro da faixa de 70-120% com um  $\text{RSD}_r$  associado menor ou igual a 20% (repetibilidade).

#### 2.5.5. Precisão intermediária ( $\text{RSD}_R$ )

A precisão intermediária ( $\text{RSD}_R$ ) foi obtida a partir de dez repetições em duas concentrações diferentes ( $0,25$  e  $1,25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), analisadas em dias diferentes pelo mesmo analista. Foram encontrados valores de  $\text{RSD}_R < 20\%$ .

#### 2.5.6. Efeito matriz (ME)

A porcentagem dos efeitos da matriz foi avaliada comparando a inclinação da curva de calibração combinada com a matriz com a inclinação da

curva de calibração do solvente obtida nos mesmos níveis de concentração (0,05; 0,075; 0,125; 0,250; 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), cada nível em triplicata usando a Equação 1.

$$ME(\%) = \left( \frac{\text{Inclinação da matriz}}{\text{Inclinação do solvente}} - 1 \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

ME = efeito de matriz, em%;

Inclinação da matriz = Inclinação da curva de calibração combinada com a matriz;

Inclinação do solvente = Declive da curva de calibração do solvente.

## 2.6. Análise das amostras de peixes

Amostras de tilápia do Nilo foram coletadas de um estudo de suplementação de dieta contendo extrato alcoólico de *Artemisia annua*. As amostras foram analisadas com o método validado neste trabalho. A tilápia foi suplementada com 0,1, 0,25 e 0,5% de extrato alcoólico de *A. annua* contendo 1,8% de ART por 30 dias. O peixe foi filetado, a pele foi removida e os músculos analisados.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Condição LC-MS/MS

A alta sensibilidade e seletividade da espectrometria de massa tornam seu uso possível para a detecção de compostos de baixa concentração em matrizes biológicas complexas (Xing, Yan, Zhang, Ren, & Gao, 2006). Várias

publicações relataram o uso de LC-MS usando diferentes modos de ionização para a quantificação de artemisinina, seus derivados e seus metabólitos (Birgersson et al., 2014; Huang, Olson, Gingrich, & Aweeka, 2013; Lindegardh et al., 2009; Wang, Wang, & Sun, 2020; Wiesner, Govender, Meredith, Norman, & Smith, 2011). O LC-MS com ionização por eletrospray (ESI) foi relatado para a determinação de artemisinina,  $\beta$ -artemeter e seu metabólito, diidroartemisinina, no plasma e na urina (Peys, Vandekerckhove, Van Hemel, & Sas, 2005; Souppart, Gauducheau, Sandrenan, & Richard, 2002; Xing et al., 2006). No entanto, este é o primeiro trabalho que descreve a determinação de artemisinina em músculos de peixes. A literatura publicada sobre essas técnicas tem se concentrado principalmente na análise de amostras aquosas (Diuzheva et al., 2020), enquanto trabalhos dedicados à análise de amostras semisólidas, como plantas e músculos, são muito menos comuns.

Neste estudo, um espectrômetro de massa de alta resolução (SYNAPT HDMS Q-TOF) (resolução  $\geq 10.000$ ) foi usado para identificação e confirmação do composto alvo pelas informações de composição elementar para íons precursores e seu íon fragmento fornecido pelo modo de aquisição de dados QTOF. Para fins quantitativos, o íon  $m/z$  ( $[M + Na]^+$ ) foi monitorado. De acordo com SANTE (SANTE, 2017), o requisito de identificação para MS de alta resolução, como Q-TOF, é de pelo menos 2 íons com precisão de massa  $\leq 5$  ppm (Figura 1) (SANTE, 2017). O modo de ionização positiva (ESI+) foi encontrado para fornecer maior sensibilidade. A fórmula molecular, o tempo de retenção (RT) e os erros de medição de massa para o precursor e o íon do fragmento para o analito alvo são mostrados na Tabela 2.



### 3.2. *Preparação de amostra*

A grande maioria dos instrumentos analíticos pode lidar apenas com amostras líquidas. Assim, antes de aplicar um procedimento de microextração, os analitos devem ser transferidos de amostras de músculo semisólido bruto para uma fase aquosa. Diferentes abordagens de extração têm sido usadas para esse fim, às vezes em conjunto com a limpeza de amostras (Diuzheva et al., 2020). Neste trabalho, a ART foi extraída do músculo de tilápia pela combinação de um QuEChERS modificado e UA-DLLME. A determinação das moléculas ativas no tecido dos peixes pode ser problemática devido à complexidade da matriz (os peixes podem conter um alto nível de lipídios). Portanto, a preparação da amostra pode ser um procedimento altamente exigente antes da quantificação por técnicas cromatográficas. Além do ART, outros constituintes da matriz podem ser coextraídos e isso é indesejável. Eles podem causar supressão ou aumento da resposta do analito, reduzindo a precisão da análise quantitativa como consequência. Por esse motivo, tanto as recuperações quanto os efeitos da matriz foram levados em consideração durante a avaliação deste procedimento. Diferentes estratégias, incluindo a escolha do solvente de extração e duas etapas de limpeza (microextração líquido-líquido dispersiva e extração em fase sólida dispersiva) podem evitar a coextração de interferências e, conseqüentemente, reduzir o efeito de matriz.

As modificações no procedimento QuEChERS utilizadas neste estudo foram baseadas em estudos desenvolvidos por Shiroma et. al (Shiroma et al., 2020) em que as quantidades de amostras, solventes e sais foram reduzidas. O método QuEChERS sem o uso de acetato foi escolhido devido à sua simplicidade, baixo custo e baixa geração de resíduos. A acetonitrila foi

utilizada como solvente de extração devido à sua capacidade de extrair o analito com poucos compostos interferentes e de promover a precipitação de proteínas (Nunes et al., 2018). A extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) com sorvente  $C_{18}$  foi utilizada na etapa de limpeza. Sorventes não polares, como octilo ou octadecil, são capazes de remover co-extratos não polares, como lipídeos e ceras. Sorbentes como o  $C_{18}$  são tradicionalmente usados para limpeza d-SPE de extratos de peixes. Nunes et al. (Nunes et al., 2018) avaliaram o uso de absorventes PSA e  $C_{18}$  para a etapa de limpeza de SPE para sulfonamidas e análise de trimetropina em filé de tilápia e mostraram que o método era simples e seletivo, e os resultados alcançados indicam que o método atende aos parâmetros adotado pelas diretrizes de validação do CE (2002) e MAPA (2011) (MAPA, 2011). Shiroma et al. (Shiroma et al., 2020) avaliaram diferentes técnicas de extração para determinação de florfenicol e florfenicol amina no músculo de tilápia e descobriram que o QuEChERS modificado usando  $C_{18}$  na etapa de limpeza foi o mais promissor. As Figuras 2 A e 2 C mostram os cromatogramas de ART no solvente e após a extração de QuEChERS modificada e limpeza de dSPE  $C_{18}$ . Embora esse método forneça extratos livres de interferência no tempo de retenção do ART, outros picos foram observados indicando a presença de outros constituintes da matriz. A quantidade de coextratantes obtida após o processo de extração selecionado para determinação de pesticidas é um parâmetro relevante em laboratório, pois pode afetar a manutenção do equipamento analítico (Assalin et al., 2014). A fim de reduzir a quantidade de componentes da matriz que são introduzidos no sistema analítico, o método de microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom foi aplicado após a etapa de limpeza d-SPE.

Primeiramente, foi coletado 1,0 mL do sobrenadante da amostra extraída, seco sob fluxo de nitrogênio e o resíduo reconstituído com 1,0 mL de água ultrapura. O UA-DLLME foi baseado no sistema de três solventes: aquoso, solvente dispersivo (acetonitrila) e solvente de extração (tolueno). Este procedimento proporcionou extratos livres de interferência no tempo de retenção da ART de 2,12 min, baixa quantidade de co-extrativos de matriz (Figura 2 C) e proporcionou boa eficiência de extração demonstrando sua adequação para extração da ART em músculo de tilápia do Nilo.

### 3.3. Método de validação

O primeiro parâmetro avaliado foi a seletividade do método. Este parâmetro determina a capacidade do procedimento de preparação da amostra e do sistema de separação e detecção de discriminar entre o analito e outros compostos. A seletividade foi avaliada por comparação dos cromatogramas obtidos da análise de amostras de peixes em branco com aqueles da análise de amostras de peixes em branco enriquecidos com ART. Não foram observados picos para compostos interferentes com o mesmo tempo de retenção que ART com o mesmo  $m/z$ . A Figura 3 mostra o cromatograma de amostras enriquecidas após a extração pelo método completo e o cromatograma de íons extraídos com ART. A curva de calibração padrão do ART foi construída traçando a concentração do analito contra as áreas dos picos, nos níveis de 0,05, 0,1, 0,125, 0,25, 0,5 e 0,75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A resposta do detector foi linear nesta faixa, com excelente relação linear e valor de  $R^2$  superior a 0,99. O LOQ foi a concentração mais baixa que foi validada com precisão aceitável pela aplicação do método analítico completo (SANTE, 2017).

A Tabela 3 resume todos os parâmetros de validação obtidos. A exatidão (recuperação) e a precisão foram obtidas por meio de dois níveis de spiking no LOQ de destino ( $0,25 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e 5x o LOQ de destino ( $1,25 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) com 5 repetições em cada nível com resultados satisfatórios. O método mostrou boa acurácia e precisão, e é adequado para quantificar ART em músculos de peixes.

Os efeitos da matriz podem resultar de vários processos físicos e químicos durante a ionização dos analitos, causando supressão ou intensificação do sinal, especialmente no modo ESI. O efeito de matriz pode resultar na supressão do sinal (ME negativo) ou aumento do sinal (ME positivo). Em geral, um forte efeito de matriz ocorreria quando os valores de ME forem menores que  $-50\%$  ou maiores que  $50\%$ . Valores na faixa de  $-50\%$  a  $50\%$  são considerados um efeito de matriz médio. Neste estudo, o efeito da matriz foi de  $-12\%$ , resultando na supressão do sinal. De acordo com Ni et al. (Ni et al., 2018); o efeito de matriz pode ser desconsiderado quando os valores de ME% estão entre  $-20\%$  a  $+20\%$  (sem efeito de matriz) (Kaczyński, 2017; Ni et al., 2018).

### 3.4. Aplicação

Para verificar a faixa de concentração que seria detectada e quantificada nos músculos da tilápia, foi realizado um teste preliminar. Amostras de filé de tilápia, alimentadas por 30 dias com doses de 0,1, 0,25 e 0,5% de extrato alcoólico de *A. annua*, contendo 1,8% de ART na dieta, foram quantificadas em concentrações que variaram de  $0,88 \pm 0,21$  a  $1,28 \pm 0,62 \mu\text{g.g}^{-1}$  de ART. Assim, o método validado pode ser aplicado com sucesso em estudos

farmacocinéticos e fitoterápicos de resíduos de administração oral de extrato de *A. annua* contendo 1,8% de artemisinina em peixes, nas doses de 0,1, 0,25 e 0,5%, desde que o LOQ do método seja 0,25  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Essas doses foram escolhidas porque são eficazes na melhoria da saúde da tilápia do Nilo cultivada (Soares et al., 2020).

#### **4. Conclusão**

O método para determinação de artemisinina no músculo de tilápia do Nilo foi desenvolvido e validado com sucesso de acordo com as diretrizes do documento SANTE 11813/2017 usando o sistema UPLC-Q-TOF com ionização de fonte de eletropulverização. Este método pode ser utilizado para a análise de ART em amostras de peixes com resultados confiáveis, curto tempo de análise, facilidade de operação e baixo consumo de solventes e reagentes, estando em consonância com a química verde.

#### **Lista de abreviações**

ART (artemisinina)

QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro)

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento)

MRL (Limite Máximo de Resíduos)

UA-DLLME (microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom)

DLLME (microextração líquido-líquido dispersiva)

UPLC-ESI-QToF (cromatografia líquida de ultra desempenho acoplada a espectrometria de massa de ionização por electrospray / quadrupolo-tempo de voo)

Q-TOF (tempo de voo ortogonal quadrupolo)

ESI (ionização de fonte de electrospray)

IPs (pontos de identificação)

SPE (extração em fase sólida)

LOD (limite de detecção)

LOQ (limite de quantificação)

RSD (desvio padrão relativo)

RSDR (precisão intermediária)

RSDr (precisão e repetibilidade)

d-SPE (extração em fase sólida dispersiva)

ME (efeito matrix)

RT (tempo de retenção)

### **Agradecimentos**

Esta pesquisa foi apoiada pelo projeto “BRS Aqua” (11.17.02.001.03.08), uma parceria entre o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) - Embrapa/BNDES (01.17.02.001. 03.08). Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

### **Aprovação ética**

Este artigo contém estudos com animais aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente (Registro 003/2016) e Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, SP, Brasil (Registro 1518230217).

## Referências

- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and. *Journal of AOAC International*, *86*, 412–431.  
<https://doi.org/10.2478/s11687-011-0011-9>
- Arroyo-Manzanares, N., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2013). Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, *1282*, 11–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.072>
- Assalin, M. R., Queiroz, S. C. N., Ferracini, V. L., Oliveira, T., Vilhena, E., & Mattos, M. L. T. (2014). A method for determination of imazapic and imazethapyr residues in soil using an ultrasonic assisted extraction and LC-MS/MS. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *93*(3), 360–364. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1330-6>
- Bhakuni, R. S., Jain, D. C., Sharma, R. P., & Kumar, S. (2001). Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Science*, *80*(1), 35–48.
- Birgersson, S., Ericsson, T., Blank, A., Hagens, C. Von, Ashton, M., & Hoffmann, K. J. (2014). A high-throughput LC-MS/MS assay for quantification of artesunate and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma and saliva. *Bioanalysis*, *6*(18), 2357–2369.  
<https://doi.org/10.4155/bio.14.116>
- Comission Decision. (2002). 96/23/EC COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044)(Text with EEA relevance) (2002/657/EC). *Official Journal of the European Communities*, (L 221/8), 8–36.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>



- Diuzheva, A., Locatelli, M., Tartaglia, A., Goga, M., Ferrone, V., Carlucci, G., & Andruch, V. (2020). Application of liquid-phase microextraction to the analysis of plant and herbal samples. *Phytochemical Analysis*, (February), 1–13. <https://doi.org/10.1002/pca.2939>
- Doan, H. Van, Soltani, E., Ingelbrecht, J., & Soltani, M. (2020). Medicinal Herbs and Plants: Potential Treatment of Monogenean Infections in Fish. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 28(2), 260–282. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1712325>
- EC. (2009). European Commission. COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, 1(15), 1–72. Retrieved from [http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg\\_2010\\_37/reg\\_2010\\_37\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf)
- Efferth, T., & Kaina, B. (2010). Toxicity of the antimalarial artemisinin and its derivatives. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(5), 405–421. <https://doi.org/10.3109/10408441003610571>
- FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., Zhou, Z., Van Doan, H., Davies, S. J., & Harikrishnan, R. (2020). Boosting Immune Function and Disease Bio-Control Through Environment-Friendly and Sustainable Approaches in Finfish Aquaculture: Herbal Therapy Scenarios. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 0(0), 1–19. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1731420>
- Huang, L., Olson, A., Gingrich, D., & Aweeka, F. T. (2013). Determination of artemether and dihydroartemisinin in human plasma with a new hydrogen peroxide stabilization method. *Bioanalysis*, 5(12), 1501–1506. <https://doi.org/10.4155/bio.13.91>
- Kaczyński, P. (2017). Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food

- of plant origin for high polar herbicides. *Food Chemistry*, 230, 524–531.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.091>
- Limbu, S. M., Zhou, L., Sun, S. X., Zhang, M. L., & Du, Z. Y. (2018). Chronic exposure to low environmental concentrations and legal aquaculture doses of antibiotics cause systemic adverse effects in Nile tilapia and provoke differential human health risk. *Environment International*, 115(March), 205–219. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.034>
- Lindegardh, N., Tarning, J., Toi, P. V., Hien, T. T., Farrar, J., Singhasivanon, P., ... Day, N. P. J. (2009). Quantification of artemisinin in human plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(3), 768–773.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.12.014>
- Lombardo-Agüí, M., García-Campaña, A. M., Cruces-Blanco, C., & Gámiz-Gracia, L. (2015). Determination of quinolones in fish by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection using QuEChERS as sample treatment. *Food Control*, 50, 864–868.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.027>
- MAPA. (2011). Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica. F\_armacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterin\_arios MAPA: Guia de Validação de Controle de Qualidade Analítica.
- Marques, T. V., Paschoal, J. A. R., Barone, R. S. C., Cyrino, J. E. P., & Rath, S. (2018). Depletion study and estimation of withdrawal periods for florfenicol and florfenicol amine in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture Research*, 49(1), 111–119. <https://doi.org/10.1111/are.13439>
- Martins, M. L., Primel, E. G., Caldas, S. S., Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2012). Microextração Líquido-Líquido Dispersiva ( DLLME ): fundamentos e aplicações. *Scientia Chromatographica*, 4(1), 35–51.
- Ni, Y., Yang, H., Zhang, H., He, Q., Huang, S., Qin, M., ... Ma, Y. (2018). Analysis of four sulfonylurea herbicides in cereals using modified Quick,

- Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe sample preparation method coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1537, 27–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.017>
- Nunes, K. S. D., Vallim, J. H., Assalin, M. R., Queiroz, S. C. N., Paraíba, L. C., Jonsson, C. M., & Reyes, F. G. R. (2018). Depletion study, withdrawal period calculation and bioaccumulation of sulfamethazine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with medicated feed. *Chemosphere*, 197, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.030>
- Peys, E., Vandenkerckhove, J., Van Hemel, J., & Sas, B. (2005). Simultaneous determination of  $\beta$ -artemether and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma and urine by a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay using electrospray ionisation. *Chromatographia*, 61(11–12), 637–641. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0556-1>
- Qin, Y., Chen, L., Yang, X., Tang, Y., Li, S., & Liu, C. (2016). Determination of 19 Representative Pesticides in Traditional Chinese Medicines by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*, 79(13–14), 875–884. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3105-1>
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M. R., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>
- Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., & Bakke, A. M. (2010). Probiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>
- SANTE. (2017). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017. *European Commission Directorate-General for Health and Food Safety*, 1–46. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33021.77283>

- Sarhadi, I., Alizadeh, E., Ahmadifar, E., Adineh, H., & Dawood, M. A. O. (2020). Skin mucosal, serum immunity and antioxidant capacity of common carp (*Cyprinus carpio*) fed artemisia (*Artemisia annua*). *Annals of Animal Science*, 1. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0011>
- Shen, Y. F., Liu, L., Chen, W. C., Hu, Y., Zhu, B., & Wang, G. X. (2018). Evaluation on the antiviral activity of arctigenin against spring viraemia of carp virus. *Aquaculture*, 483, 252–262. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.001>
- Shiroma, L. S., Queiroz, S. C. N., Jonsson, C. M., & Bottoli, C. B. G. (2020). Extraction Strategies for Simultaneous Determination of Florfenicol and Florfenicol Amine in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Muscle: Quantification by LC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, 13(1), 291–302. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01633-1>
- Soares, M. P., Cardoso, I. L., Ishikawa, M. M., de Oliveira, A. da S. S., Sartoratto, A., Jonsson, C. M., ... Sampaio, F. G. (2020). Effects of *Artemisia annua* alcohol extract on physiological and innate immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to improve health status. *Fish & Shellfish Immunology*, 105(May), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.035>
- Souppart, C., Gauducheau, N., Sandrenan, N., & Richard, F. (2002). Development and validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of artemether and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 774(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00207-6](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00207-6)
- Tayebe, S., Mehrnaz, K., Khosro, P., & Tahere, H. (2012). Morphological evaluation of hairy roots induced in *Artemisia annua* L. and investigating elicitation effects on the hairy roots biomass production. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2(S), 1005–1013.
- Van Nieuwerburgh, F. C. W., Vande Castele, S. R. F., Maes, L., Goossens, A.,

- Inzé, D., Van Bocxlaer, J., & Deforce, D. L. D. (2006). Quantitation of artemisinin and its biosynthetic precursors in *Artemisia annua* L. by high performance liquid chromatography-electrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1118*(2), 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.121>
- Wang, Y., Wang, Y., & Sun, Y. (2020). Quantitative determination of artemisinin in rat hemolyzed plasma by an HPLC–HRMS method. *Biomedical Chromatography*, *34*(1). <https://doi.org/10.1002/bmc.4696>
- WHO. (2014). *World malaria report 2013*. World Health Organization.
- Wiesner, L., Govender, K., Meredith, S. A., Norman, J., & Smith, P. J. (2011). A liquid-liquid LC/MS/MS assay for the determination of artemether and DHA in malaria patient samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *55*(2), 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.01.036>
- Wu, Z., Ling, F., Song, C., Chen, W., & Wang, G. (2016). Effects of oral administration of whole plants of *Artemisia annua* on *Ichthyophthirius multifiliis* and *Aeromonas hydrophila* after parasitism by *I. multifiliis*. *Parasitology Research*, *116*(1), 91–97. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5265-1>
- Xing, J., Yan, H., Zhang, S., Ren, G., & Gao, Y. (2006). A high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of artemisinin in rat plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *20*, 1463–1468. <https://doi.org/10.1002/rcm.2467>
- Yun, C., Jung, Y., Chun, W., Yang, B., Ryu, J., Lim, C., ... Cho, S. I. (2016). Anti-Inflammatory Effects of *Artemisia* Leaf Extract in Mice with Contact Dermatitis in Vitro and in Vivo. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8027537>

Tabela 1: Descrição da artemisinina.

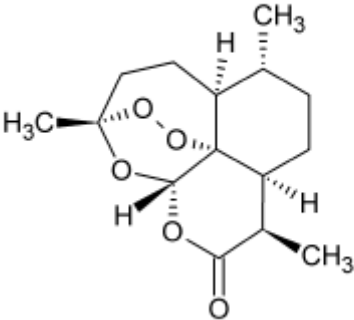
Composto	Propriedades
<b>Artemisinina</b> 	Massa molar: 282,33 g mol <sup>-1</sup> Ponto de fusão: 156-157 °C Densidade: 1,24 g / cm <sup>3</sup> (20 °C) Coeficiente de partição (log K <sub>ow</sub> em pH 7,0): 2,90 Solubilidade em água: 49,7 mg L <sup>-1</sup>

Tabela 2. Composição elementar, tempo de retenção (RT) e erros de medição de massa para o precursor e fragmento de íon para analito alvo.

Compostos Direcionados	Fórmula molecular	RT (min)	Íons de quantificação	Massa de medição (Da) (Error ppm)	Íons de fragmento (ppm de erro)
Artemisinina	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	2,12	[M + Na] <sup>+</sup>	305,1369 (1,3)	219,1385 (0,0)

Tabela 3. Parâmetros de validação de um método UA-DLLME seguido por um UPLC-MS / MS para a determinação de artemisinina em amostras de tilápia.

<b>Parâmetros de validação</b>	
Faixa Linear - Curva analítica em solvente / ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.025-0.75
Faixa Linear - Curva analítica na matriz de peixes / ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0.125-0.375
Coeficiente de regressão (R) – solvente	0.996
Coeficiente de regressão (R) - matriz de peixes	0.993
Efeito Matriz / (%)	-12.0
Limite de detecção (LOD) / ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0.05
Limite de quantificação (LOQ) / ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0.25
Repetibilidade ( $\text{RSD}_r$ %)	
0.25 $\mu\text{g g}^{-1}$	13.8
1.25 $\mu\text{g g}^{-1}$	10.9
Precisão intermediária ( $\text{RSD}_R$ )	
0.25 $\mu\text{g g}^{-1}$	15.8
1.25 $\mu\text{g g}^{-1}$	12.5
Precisão (recuperação) %	
0.25 $\mu\text{g g}^{-1}$	71.0
1.25 $\mu\text{g g}^{-1}$	74.9



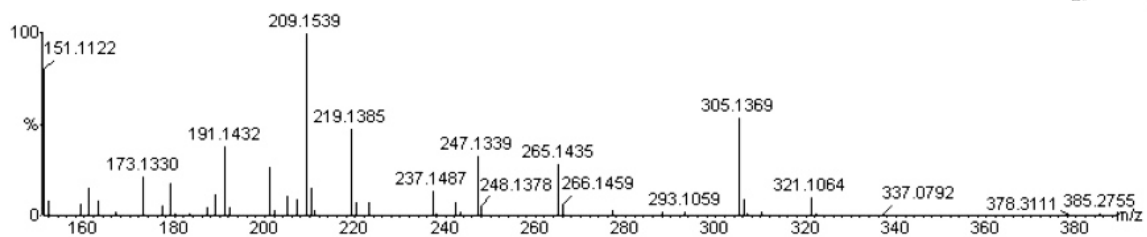


Figura 1. Espectro de massa após infusão direta de artemisinina (ART). Condições do equipamento: capilar 3,0 kV, cone de amostragem 30 V, cone de extração 5,1 V, temperatura da fonte -110 °C, gás de dessolvatação 400 °C, gás de cone (fluxo) 20 L/h, gás de dessolvatação (fluxo) 450L/h, tempo de varredura 0,5 s.

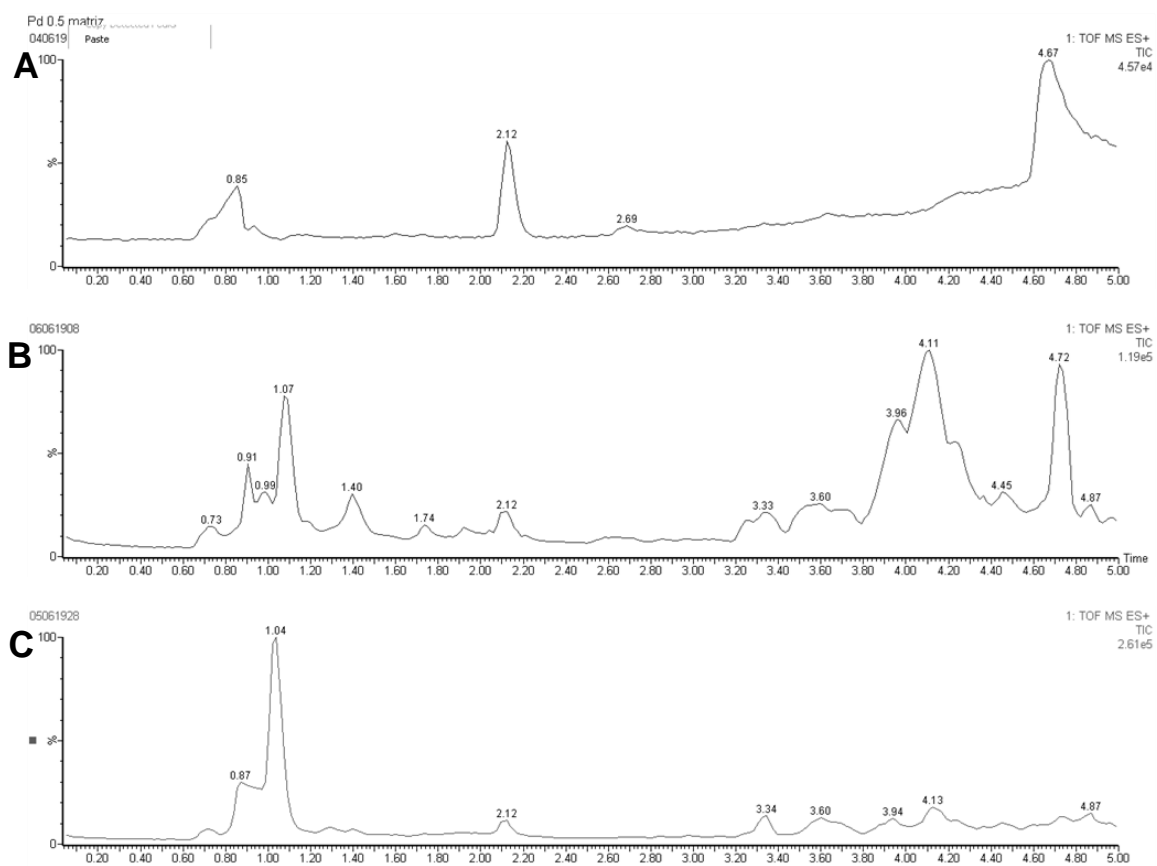


Figura 2. Cromatogramas: **A.** Padrão no solvente (a 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), analito em tR 2,12 min, **B.** analito após QuEChERS modificado, **C.** analito após QuEChERS modificado seguido por UA-DLLME (método completo).

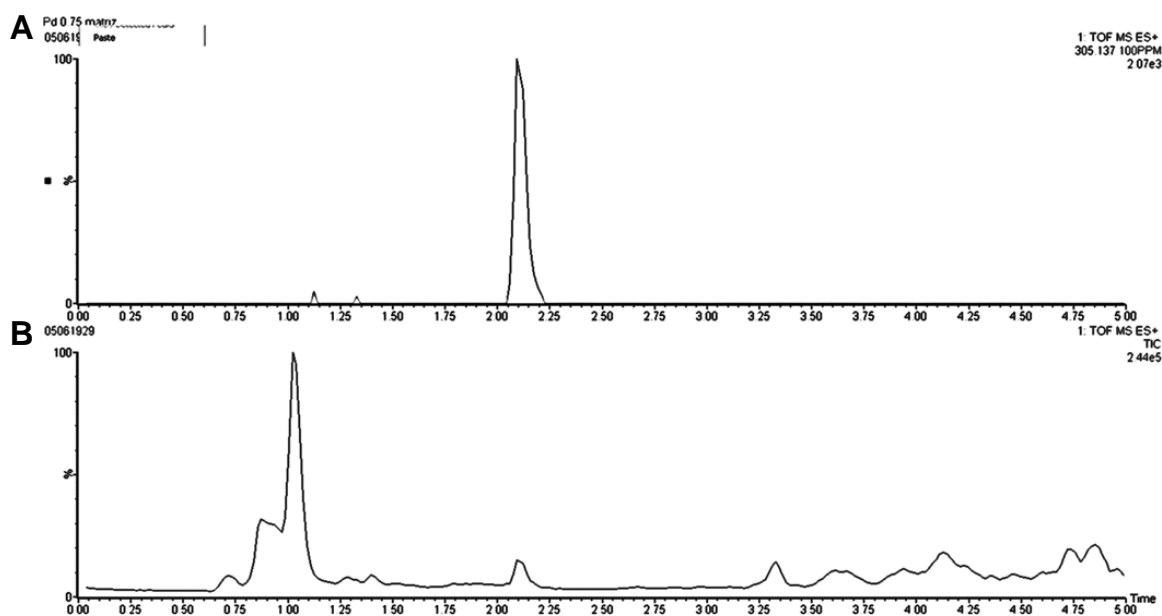


Figura 3. Cromatogramas **A.** cromatograma de íons extraídos com ART tR 2,12 min; **B.** analito após QuEChERS modificado seguido por UA-DLLME (método completo). Condições do equipamento: capilar 3,0 kV, cone de amostragem 30 V, cone de extração 5,1 V, temperatura da fonte -110 °C, gás de dessolvatação 400 °C, gás de cone (fluxo) 20 L/h, gás de dessolvatação (fluxo) 450 L/h, tempo de varredura 0,5 s.

## CAPÍTULO VI

---

### Considerações Finais



## Considerações Finais

Esta tese pretendeu contribuir para o emprego da planta *Artemisia annua* como um agente alternativo promissor para melhorar a produção e o controle de doenças parasitárias em peixes cultivados, evitando assim o uso de antibióticos sintéticos. Com base nos resultados apresentados neste trabalho, é evidente que:

i. a inclusão de extrato alcoólico de *Artemisia annua* na dieta de tilápia do Nilo traz benefícios para desempenho produtivo e estímulo sobre o sistema imune dos peixes, evitando os efeitos supressivos do estresse e melhorando a resistência ao patógeno, garantindo maior sobrevivência dos peixes cultivados.

ii. componentes bioativos do extrato e frações alcoólicas de *A. annua* apresentam potencial eficácia para inibir o crescimento e eliminar *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare* e podem ser aplicados no tratamento de infecções bacterianas, reduzindo o uso de antibióticos sintéticos na piscicultura.

Alguns pontos podem ser destacados como relevantes para a continuação da presente linha de pesquisa e que dariam suporte a continuação do desenvolvimento tecnológico:

i. Deve-se considerar a investigação para diferentes fases de criação, tal como a alevinagem, pois os benefícios da utilização de extrato alcoólico de *A. annua* na dieta em peixes talvez possam atenuar, por exemplo, a alta mortalidade nas fases iniciais para muitas espécies, diminuindo as perdas econômicas e maximizando a produção.

ii. Novas investigações devem ser incentivadas com períodos menores e maiores do que quatro semanas (média do tempo de suplementação da maior parte dos estudos com imunoestimulante para peixes) para efetivamente concluir sobre a melhor relação custo/benefício.

iii. Testes *in vivo* usando componentes bioativos do extrato e frações de *A. annua* devem ser realizados para estabelecer protocolos de tratamento contra doenças bacterianas na piscicultura.

iv. O método desenvolvido e validado para determinar a artemisinina no músculo de tilápia do Nilo pode ser utilizado em estudos futuros para verificar se a suplementação deixa resíduos que podem prejudicar o consumidor, com resultados confiáveis, análises rápidas, com facilidade de operação e análise de curto prazo.

Os resultados desta tese demonstram claramente que:

i. a utilização da formulação de ração contendo suplementação com extrato alcoólico de *A. annua* pode beneficiar a aquicultura pelo potencial em aumentar a eficiência produtiva ao setor de piscicultura, pois proporciona melhoria na conversão alimentar, maior crescimento, melhora do sistema imune e minimizar a resposta ao estresse dos peixes de cultivo.

ii. reforça os benefícios da adoção de estratégias alimentares, incluindo a ração formulada contendo suplementação com extrato alcoólico de *A. annua* por 30 dias, antes do manejo intensivo dos peixes de produção e para trazer benefícios para a saúde dos animais, melhorando a resistência frente as principais bactérias que acometem a espécie. Portanto, atende uma das

maiores demandas do setor produtivo de tilápias, o peixe mais produzido no Brasil e no mundo, que tem sofrido perdas produtivas em decorrência do aumento da ocorrência de bactérias.