

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E
RECURSOS PESQUEIROS

POTENCIAL *in vitro* E *in vivo* DE ÓLEOS ESSENCIAIS
CONTRA A INFECÇÃO POR *Neoechinorhynchus buttnerae* EM
Colossoma macropomum

MARIA INÊS BRAGA DE OLIVEIRA

MANAUS – AM

2020

MARIA INÊS BRAGA DE OLIVEIRA

POTENCIAL *in vitro* E *in vivo* DE ÓLEOS ESSENCIAIS
CONTRA A INFECÇÃO POR *Neoechinorhynchus buttnerae* EM
Colossoma macropomum

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

Orientadora: Dra. Edsandra Campos Chagas

MANAUS-AM

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O48p Oliveira, Maria Inês Braga de
Potencial in vitro e in vivo de óleos essenciais contra a infecção
por *Neoechinorhynchus buttnerae* em *Colossoma macropomum* /
Maria Inês Braga de Oliveira . 2020
100 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Edsandra Campos Chagas
Tese (Doutorado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Viabilidade. 2. Acantocephala. 3. Tambaqui. 4. plantas
medicinais. 5. anti-helmíntico. I. Chagas, Edsandra Campos. II.
Universidade Federal do Amazonas III. |Título

MARIA INÊS BRAGA DE OLIVEIRA

Potencial *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais contra a infecção por *Neoechinorhynchus buttnerae* em *Colossoma macropomum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

Aprovado em 27 de novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Dra. Edsandra Campos Chagas - Presidente
EMBRAPA Amazônia Ocidental



Dr. Maurício Laterça Martins - Membro
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC



Dr. Marcos Tavares Dias - Membro
EMBRAPA Amapá



Dr. José Fernando Marques Barcellos - Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Dra. Christiane Patrícia Feitosa de Oliveira - Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Antônio e
Terezinha e seus netos
João, Alice,
Evandro e José;*

*à Cristina Sayuri Maki,
in memoriam,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Dra Edsandra Campos Chagas pela oportunidade que tive de me aventurar na área de sanidade de peixes cultivados e adquirir tantos novos conhecimentos, que vou levar para a vida profissional; pela possibilidade de coorientação em iniciação científica e participação em pesquisas que resultaram em valorosas publicações. Mas especialmente pelo suporte emocional, paciência, consideração e amizade ao longo de toda a jornada;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) por todo apoio logístico para a realização da pesquisa;

Às coordenadoras do Programa de Pós-graduação, professoras Kedma Yamamoto e Flávia Souza pela constante busca de melhorias no curso; aos pesquisadores do PPGCIPET que no exercício da docência nos repassam suas vivências na pesquisa e contribuem com o processo de qualificação que buscamos;

Aos excelentes parceiros nos trabalhos técnicos de laboratório: Ma. Iraní Moraes e Dra. Cláudia Majolo e de campo: Sr. Edson Paiva Afonso e Sr. José Marconde da Costa e Silva, por todo o suporte técnico que torna possível a realização da pesquisa;

Aos doutores Francisco Celio Maio Chaves e Marcelo Róseo de Oliveira, responsáveis pelo setor de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental, pela incansável dedicação em todas as etapas da pesquisa com plantas medicinais;

Aos parceiros de trabalho que se tornaram amigos: Franmir Brandão, Caio Santana Farias e Damy Caroline de Melo Souza. Que continuemos nessa troca de aprendizagem mútua e muitas conversas engraçadas;

À pesquisadora Ma. Lorena Vieira de Matos pelo suporte valioso no processamento e análises histopatológicas. A “minha filha da UFAM”, orientanda de TCC que cresceu com profissionalismo e dedicação, parceira de pesquisa, e como se não bastasse uma amiga extraordinária. Muito obrigada por tudo.

Aos caros amigos do departamento de Morfologia da UFAM, minha casa, pela força e incentivo de todos, em especial aos professores doutores Marcela Magalhães, Grazyelle Sebrenski, Fernando Marques, Adriana Dantas e Felipe Pessoa; a amizade e a parceria de vocês me possibilitaram ser mãe-professora-orientadora-extensionista e doutoranda.

À Mae celestial, Maria meu refúgio, meu exemplo de mãe e mulher. Às Marias da Terra, Maria auxiliadora (mana Dora) e Maria Gracimar (Gal) expresso meu amor, admiração e gratidão; às Matriarcas que estão no céu Maria Antonia (tia Tonica), Maria Nazaré (Tia Nazaré) e Maria Izaura (vó Izaura), anjos de luz com seus terços em preces por nós.

À Deus, pela minha família, minha referência em valores e pela oportunidade que tive ao longo do doutoramento, de enxergar minhas pequenezas, superar as dificuldades e assim exercer melhor a minha humanidade, a grande conquista de fato, se esperamos em Ti e por Ti.

AGRADEÇO!

Entes da floresta me revelem o segredo
E conduzam o meu caminhar
Do mundo esotérico trago conhecimento
Pela revolução milenar

O xamanismo de sacacas herdei
A alquimia com as ervas criei
O dom da cura, ensinamento ancestral
Altar da encantaria
É ritual

Com a benção tiro mau-olhado
Afasto o quebranto pra longe de ti
Viu visagem ou bicho-do-fundo
É reza que falta para ti proteger

A fé do povo das senzalas
Das marombas, das ocaras
Herança dos povos ancestrais
Animismo, misticismo, meu chocalho, meu cachimbo
A conjurar, meditar, espantar todo o mal
Sabedoria cabocla me guia em mistérios do além

Gabriel Moraes / Guto Kawakami

RESUMO GERAL

Neoechinorhynchus buttnerae é um acantocéfalo encontrado no intestino do tambaqui *Colossoma macropomum* e, atualmente, o maior entrave no cultivo desse peixe. Em elevadas taxas de infecção, este parasito tem comprometido a produção, especialmente na região norte do Brasil. Assim, a primeira etapa deste estudo visou avaliar o tempo de sobrevivência *in vitro* de *N. buttnerae* usando o meio essencial mínimo de Eagle (MEME) suplementado com antibióticos, sob diferentes metodologias de manutenção, visando propor um protocolo alternativo para a manutenção de espécimes de *N. buttnerae* fora do hospedeiro, que garanta uma maior confiabilidade na realização de futuros testes com anti-helmínticos, para o controle deste parasito. Os resultados da análise de sobrevivência indicaram que a utilização do meio MEME com substituição a cada dois dias, associado à suplementação com antibióticos prolongou significativamente o tempo de sobrevivência dos parasitos quando mantido na faixa de temperatura de 24 a 28°C. Este protocolo foi adotado na segunda etapa deste estudo, que teve como finalidade avaliar a composição química bem como o potencial anti-helmíntico *in vitro* de 11 espécies de óleos essenciais (OEs) obtidos de diferentes plantas medicinais, no controle de *N. buttnerae*, a partir de um delimitamento experimental com um grupo controle e nove concentrações de cada óleo essencial, em triplicata, após 2 horas, 6 horas e 24 horas de exposição. Observou-se redução nos valores das Concentrações Efetivas (CE₅₀) dos óleos essenciais com o aumento do tempo de exposição, sendo os menores valores obtidos com os OEs de *Mentha arvensis*, *Lippia grata*, *Lippia origanoides*, *Croton cajucara* morfotipo vermelha, *Ocimum gratissimum*, *Croton cajucara* morfotipo branca e *Piper aduncum*. Quanto à eficácia *in vitro* no controle de *N. buttnerae*, todos os óleos essenciais apresentaram 100% de eficácia em 24 horas. A análise estrutural dos helmintos expostos aos OEs sugere que a mortalidade está associada a dissociação do tegumento da camada muscular subjacente, edema nos espaços lacunares com formação de bolhas na subcutícula, inchaço corporal, aumento no volume da cavidade pseudocelomática e degeneração dos órgãos reprodutivos. Portanto, todos os óleos essenciais avaliados apresentam potencial para o controle *in vivo* de *N. buttnerae*. A eficácia anti-helmíntica dos OEs de *L. grata*, *L. origanoides* e *O. gratissimum* foi avaliada no controle *in vivo* de *N. buttnerae* em *C. macropomum*, além dos parâmetros de crescimento, hematológicos, bioquímicos, enzimáticos e histopatológicos. Juvenis de tambaqui naturalmente infectados por *N.*

buttnerae, após 30 dias de alimentação com ração contendo OEs de *L. grata* (0,86 g kg⁻¹), *L. origanoides* (0,76 g kg⁻¹) e *O. gratissimum* (1,03 e 2,06 g kg⁻¹), resultaram em 100% de sobrevivência dos peixes, redução na intensidade e abundância média parasitária e o percentual médio de eficácia anti-helmíntica dos OEs ficou entre 43.9 e 62.1%. Destaca-se que após o uso dos OES de *L. grata*, *L. origanoides* e *O. gratissimum* os parâmetros morfofisiológicos indicaram a manutenção da homeostase orgânica nos peixes, portanto esses OEs são boas alternativas terapêuticas no controle da acantocefalose em *C. macropomum*.

Palavras-chave: acantocefalose, óleos essenciais, fisiologia, histopatologia, piscicultura

ABSTRACT

Neoechinorhynchus buttnerae is an acanthocephalan found in the intestine of the tambaqui *Colossoma macropomum* and is currently the major constraint in the culture of this fish. At high infection rates, this parasite has compromised production, especially in northern Brazil. Thus, the first stage of this study aimed to evaluate the *in vitro* survival time of *N. buttnerae* using the minimum essential medium of Eagle (EMEM) supplemented with antibiotics, under different maintenance methodologies, in order to propose an alternative protocol for the maintenance of *N. buttnerae* specimens outside the host, which guarantees greater reliability in future tests with anthelmintics for the control of this parasite. The results of the survival analysis indicated that the use of the MEME medium with replacement every two days, associated with supplementation with antibiotics, significantly prolonged the survival time of the parasites when kept in the temperature range of 24 to 28 °C. This protocol was adopted in the second stage of this study, which aimed to evaluate the chemical composition as well as the *in vitro* anthelmintic potential of 11 species of essential oils (OEs) obtained from different medicinal plants, in the control of *N. buttnerae*, from an experimental delineation with a control group and nine concentrations of each essential oil, in triplicate, after 2 hours, 6 hours and 24 hours of exposure. There was a reduction in the Effective Concentrations (EC₅₀) values of the essential oils with an increase in exposure time, the lowest values being obtained with the OEs of *Mentha arvensis*, *Lippia grata*, *Lippia origanoides*, *Croton cajucara* morphotype red, *Ocimum gratissimum*, *Croton cajucara* morphotype white and *Piper aduncum*. As for the *in vitro* efficacy of *N. buttnerae* control, all the essential oils were 100% effective within 24 hours. Structural analysis of helminths exposed to OEs suggests that mortality is associated with dissociation of the tegument from the underlying muscle layer, edema in the lacunar spaces with formation of subcuticle bubbles, body swelling, increased volume of the pseudocelloma and degeneration of the reproductive organs. Therefore, all the essential oils evaluated have potential for the *in vivo* control of *N. buttnerae*. The anthelmintic efficacy of *L. grata*, *L. origanoides* and *O. gratissimum* OEs was evaluated in the *in vivo* control of *N. buttnerae* in *C. macropomum*, besides the growth, hematological, biochemical, enzymatic and histopathological parameters. Juveniles of tambaqui naturally infected by *N. buttnerae*, after 30 days of feeding containing OEs of *L. grata* (0.86 g kg⁻¹), *L. origanoides* (0.76 g kg⁻¹) and *O. gratissimum* (1.03 and 2.06 g kg⁻¹), resulted in 100%

survival of the fish, reduction in the intensity and average parasitic abundance and the average percentage of anthelmintic efficacy of OEs was between 43.9 and 62.1%. It should be noted that after the use of OEs of *L. grata*, *L. origanoides* and *O. gratissimum* the morphophysiological parameters indicated the maintenance of organic homeostasis in the fish, therefore these OEs are good therapeutic alternatives in the control of acanthocaphalosis in *C. macropomum*.

Keywords: acanthocaphalosis, essential oils, physiology, histopathology, fish farming

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Padrões morfológicos observados em espécimes de *Neoechinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle (MEME) suplementado com antibióticos. A: parasitos vivos com enrolamento da porção posterior do metasoma (seta), enrugamento característico do tegumento (cabeças de seta) e a transparência do corpo com fácil visualização do pseudoceloma e dos órgãos internos. B: parasitos moribundos com inchaço corporal (estrela), perda do enrugamento do tegumento e sem eversão da probóscide (p) mesmo sob estímulo. C: parasitos mortos, escurecidos e distendidos, com inchaço corporal (estrela) com perda do enrugamento do tegumento, com deterioração dos órgãos internos (asterisco) ou desidratados e friáveis em deterioração. Barra: 1cm.40

Figura 2. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier estimadas para *Neoechinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle. A: meio sem suplementação com antibióticos e sem reposição (SASR [--]). B: meio suplementado com antibióticos e sem reposição do meio (CASR [+]). C: Meio suplementado com antibióticos e com reposição do meio (CACR [++]).41

Capítulo 2

Figura 1. Eficácia anti-helmíntica *in vitro* de óleos essenciais contra *Neoechinorhynchus buttnerae* em diferentes tempos de exposição (A – *Adenocalymna alliaceum*, B – *Allium sativum*, C – *Aloysia triphylla*, D – *Croton cajucara* morfotipo branca, E – *Croton cajucara* morfotipo vermelha, F – *Curcuma longa*, G – *Ocimum gratissimum*, H – *Piper aduncum*). Asteriscus indicam diferença significativa na eficácia entre os tempos do tratamento ($p < 0,05$).64

Figura 2. Eficácia anti-helmíntica *in vitro* de óleos essenciais contra *Neoechinorhynchus buttnerae* em diferentes tempos de exposição (a – *Lippia grata*, b – *Lippia origanoides*, c – *Mentha arvensis*). Asteriscus indicam diferença significativa na eficácia entre os tempos do tratamento ($p < 0,05$).65

Figura 3. Efeito do óleo essencial de *Aloysia triphylla* na morfologia do *Neoechinorhynchus buttnerae*. (A) estrutura do tegumento em espécime não tratado com óleo essencial (grupo controle): cutícula (seta curta) na superfície externa do tegumento e sob esta a zona estriada, delgada e clara; subjacente a esta, a zona fibrosa em feltro, mais espessa e intensamente corada (estrela preta) e a zona fibrosa radial (estrela branca); L: lacuna no tecido sincicial da subcutícula; M: camada muscular; P: pseudoceloma; T: testículo; (B) criptas no tegumento em espécime não tratado com óleo essencial (grupo controle); (C) tegumento íntegro de *N. buttnerae* vivo após 24 h de exposição ao óleo essencial de *A. triphylla* ($0,39 \text{ mg mL}^{-1}$); (D) *N. buttnerae* após tratamento com $0,78 \text{ mg mL}^{-1}$ de óleo essencial; (E) edema dos espaços lacunares com formação de bolhas e dissociação entre a camada muscular e a subcutícula, em espécimes tratados com 50 mg mL^{-1} do óleo essencial; (F) expansão do espaço

pseudocelomático associado ao inchaço corporal em espécime tratado com 12,5 mg mL⁻¹ do óleo de *A. triphylla*.....66

Capítulo 3

Figura 1. Valores médios de glicose (A), proteínas totais (B), albumina (C) e triglicérides (D) para *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa (teste de Dunn, p>0,05). Lg = *Lippia grata*, Lo = *Lippia origanoides*, Og = *Ocimum gratissimum*.....89

Figura 2. Valores de atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferas (AST), alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) para *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa (teste de Tukey, p<0,05). Lg = *Lippia grata*, Lo = *Lippia origanoides*, Og = *Ocimum gratissimum*.....90

Figura 3. Identificação dos danos histopatológicos no fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* após 30 dias de tratamento com as dietas teste contendo óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*. A: estrutura histológica do fígado saudável; Hepatócitos (He) poliédricos organizados em cordões com núcleo central em torno dos capilares sinusoides (S); B: Danos de grau 1 mais comuns: hipertrofia (H) e vacuolização dos hepatócitos (*) e dilatação dos capilares sinusoides (D); C. Danos de grau 2 mais frequentes: rompimento celular (seta) de hepatócitos hipertrofiados com núcleos picnóticos; D. dano de grau 3: dissolução de pequenos grupos de hepatócitos e seus núcleos e perda da arquitetura normal do parênquima hepático, correspondente a necrose focal (N).....91

Figura 4. Frequência de ocorrência dos valores percentuais do índice de alteração histopatológica (IAH) por escala de dano (0-20 danos leves; 21-50 danos leves a moderados; 51-100 danos moderados a graves; >100 danos graves e irreparáveis) no tecido hepático de *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*. Lg = *Lippia grata*, Lo = *Lippia origanoides*, Og = *Ocimum gratissimum*.....92

Figura 5. Frequência de ocorrência dos valores médios do índice de alteração histopatológica (IAH) (A) e do valor médio da alteração (VMA) (B) no tecido hepático de *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey p<0,05). Lg = *Lippia grata*, Lo = *Lippia origanoides*, Og = *Ocimum gratissimum*.....94

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Período mediano, máximo e de 100% de sobrevivência, em dias, do *Neoechinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle, sem suplementação com antibióticos e sem reposição do meio (SASR [--]) e comparação por teste de Log-Rank, das curvas de sobrevivência entre diferentes temperaturas.....42

Tabela 2. Período mediano, máximo e de 100% de sobrevivência, em dias, do *Neoechinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle, com suplementação com antibióticos e sem reposição do meio (CASR [+]) e comparação por teste de Log-Rank, das curvas de sobrevivência entre diferentes temperaturas.42

Tabela 3. Período mediano, máximo e de 100% de sobrevivência, em dias, do *Neoechinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle, com suplementação com antibióticos e com reposição do meio (CACR [++]) e comparação por teste de Log-Rank, das curvas de sobrevivência entre diferentes temperaturas.43

Tabela 4. Comparação entre as temperaturas por teste de Log-Rank, das curvas de sobrevivência estimadas para *Neoechinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle, sem suplementação com antibióticos e sem reposição do meio (SASR[--]); suplementado com antibióticos e sem reposição do meio (CASR [+]) e suplementado com antibióticos e com reposição do meio (CACR [++])......43

Capítulo 2

Tabela 1. Dados taxonômicos e principais constituintes dos óleos essenciais das plantas medicinais utilizadas nos ensaios *in vitro*.....67

Tabela 2. Efeito *in vitro* dos óleos essenciais sobre a mortalidade (média \pm erro padrão) de *Neoechinorhynchus buttnerae* após 24 h de exposição.....68

Tabela 3. Valores de concentrações efetivas (CE₅₀) dos óleos essenciais avaliados contra *Neoechinorhynchus buttnerae*, em diferentes tempos de exposição.....69

Capítulo 3

Tabela 1. Percentual dos componentes químicos identificados nos óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia organoides* e *Ocimum gratissimum*. IR: índice de retenção.....94

Tabela 2. Valores dos índices parasitários e da eficácia anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia organoides* e *Ocimum gratissimum* no controle da infecção por *Neoechinorhynchus buttnerae* em *Colossoma macropomum*.....95

Tabela 3. Parâmetros de desempenho zootécnico de *Colossoma macropomum*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleo essencial de *Lippia grata*, *Lippia organoides* e *Ocimum gratissimum*.....95

Tabela 4. Valores médios dos parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleo essencial de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*.....96

Tabela 5. Frequência de ocorrência, por grau de dano, das alterações histopatológicas observados no fígado de *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleo essencial de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*.....97

SUMÁRIO

Introdução geral	17
Referências	20
Capítulo 1	
Protocolo para manutenção <i>in vitro</i> de <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i>	25
1. Introdução	26
2. Material e métodos	28
2.1 Aquisição dos peixes e parasitos	28
2.2 Ensaios de viabilidade	28
2.3 Análise estatística	29
3. Resultados	29
3.1 Viabilidade dos acantocéfalos: motilidade e morfologia	29
3.2 Tempo de sobrevivência em diferentes condições de manutenção e temperatura	30
3.3 O efeito da temperatura no tempo de sobrevivência entre os tratamentos	31
4. Discussão	31
5. Conclusão	35
6. Referências	35
Capítulo 2	
Eficácia anti-helmíntica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais no controle de <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> , um endoparasita de <i>Colossoma macropomum</i>	45
1. Introdução	47
2. Material e métodos	48
2.1 Obtenção dos óleos essenciais	48
2.2 Peixes e aclimatação	49
2.3 Ensaios <i>in vitro</i> com óleos essenciais no controle de <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i>	49
2.4 Análise estrutural de <i>N. buttnerae</i> exposto ao óleo essencial de <i>A. triphylla</i>	50
2.5 Análises estatísticas	50
3 Resultados	51
3.1 Composição química dos óleos essenciais	51
3.2 Viabilidade de <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> após 24 horas de exposição aos óleos essenciais	51
3.3 Concentrações efetivas (CE ₅₀) dos óleos essenciais para <i>N. buttnerae</i> em diferentes tempos de exposição	52
3.4 Eficácia antihelmíntica <i>in vitro</i> contra o <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i>	53
3.5 Alterações histológicas de <i>N. buttnerae</i> após exposição ao óleo essencial de <i>A.</i>	53

triphylla

4. Discussão	54
5. Conclusões	57
6. Referências	58

Capítulo 3

Uso dos óleos essenciais de <i>Ocimum gratissimum</i> , <i>Lippia grata</i> e <i>Lippia origanoides</i> no controle do acantocéfalo <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> em <i>Collossoma macropomum</i>	71
1. Introdução	73
2. Material e métodos	74
2.1. Obtenção dos peixes e climatização	74
2.2. Preparo das dietas experimentais	75
2.3. Delineamento experimental	75
2.4. Parâmetros de crescimento	76
2.5. Determinação dos parâmetros sanguíneos	76
2.6. Avaliação parasitológica	77
2.7. Análise histopatológica	77
2.8. Análises estatísticas	77
3. Resultados	78
3.1. Intensidade parasitária e eficácia anti-helmíntica dos óleos essenciais incorporados à dieta de <i>Collossoma macropomum</i>	78
3.2. Parâmetros de desempenho zootécnico	78
3.3. Parâmetros hematológicos e bioquímicos	79
3.4. Parâmetros enzimáticos	80
3.5. Avaliação histopatológica do fígado	80
4. Discussão	81
5. Conclusões	84
6. Referências	84
Considerações finais	98

INTRODUÇÃO GERAL

Na piscicultura, inúmeras investigações relatam a perda do equilíbrio na relação entre parasitos, hospedeiros e ambiente (Tavares-Dias e Martins, 2017). A alta densidade de estocagem comum nos sistemas de produção, aumenta o contato entre os indivíduos potencializando as taxas de transmissão, o que pode levar a surtos epizooticos de doenças (Costa et al., 2018). No Brasil, onde a piscicultura é uma atividade sócio econômica significativa e em expansão, relatam-se doenças de diversas origens em sistemas de criação intensiva, com destaque para as doenças causadas por ectoparasitos e endoparasitos (Martins et al., 2010; Pádua et al., 2013; Moreira et al., 2013; Valladão et al., 2014; Fujimoto et al., 2019; Chagas et al., 2019).

Dentre os endoparasitos que acometem os peixes no cultivo, os helmintos (vermes metazoários) são frequentemente negligenciados como agentes causadores de doenças (Chagas et al., 2015; 2017; Souza et al., 2019). No entanto, a propagação e o estabelecimento de helmintos parasitos de peixes podem ter consequências prejudiciais para a saúde destes organismos quando presentes em números elevados dentro de uma população cultivada com práticas de manejo deficiente e falta de planos de biossegurança (Matos et al., 2017; Soler-Jimenes et al., 2017).

Um grupo importante de helmintos parasitos de peixes são os Acanthocephala (Tarachewiski, 2000; Kennedy, 2006; Sanil, 2011; Santos et al., 2013). Acantocéfalos são vermes endoparasitos que compreendem cerca de 1.100 espécies (Golvan, 1994), com aproximadamente metade encontrados como adultos no intestino de peixes (Nikol, 2006). Os danos mecânicos irreversíveis causados pela fixação da probóscide afetam a arquitetura dos tecidos intestinais levando a alterações histopatológicas (Sanil et al., 2010; Matos et al., 2017; Aguiar et al., 2018).

No Brasil, acantocéfalos de diferentes gêneros foram registrados em peixes cultivados. *Echinorhynchus briconi* foi relatado em matrinxãs *Brycon amazonicus* criadas em sistema de cultivo intensivo em canal de igarapé e em tanques-rede (Andrade e Malta, 2006; Malta et al., 2009), *Polyacanthorhynchus macrorhynchus* em em pirarucu *Arapaima gigas* (Marinho et al., 2013) e o *Neoechinorhynchus* sp. em pirarucu e pirapitinga *Piaractus brachypomus* (Silva et al., 2016; Oliveira et al., 2019). *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956 tem sido alvo de grande interesse

por pesquisadores da área de sanidade de peixes, pois é o acantocéfalo que parasita tambaqui *Colossoma macropomum* e seus híbridos (Malta et al., 2001; Silva et al., 2013; Chagas et al., 2015; Pereira e Morey, 2018).

O tambaqui é a espécie nativa de maior valor comercial e a mais cultivada na região norte do Brasil (Gomes et al., 2020; Valladão et al., 2020) e líder na produção dentre as espécies nativas (IBGE, 2019). Atualmente, é notório o aumento na demanda de tambaqui nos supermercados, sendo uma das espécies mais populares da Amazônia, apreciada pelo sabor e de grande representatividade na alimentação (IBGE, 2017).

Estudos recentes registram para essa relação tambaqui x *N. buttnerae*, o ciclo de vida do parasito (Lourenço et al., 2018); ocorrência de elevadas taxas de infecção em ambiente de cultivo (Malta et al., 2001; Matos et al., 2017; Lourenço et al., 2017; Chagas et al., 2019; Valladão et al., 2020); danos morfológicos em diversos graus, resultantes da acantocefalose (Matos et al., 2017; Aguiar et al., 2018) e evidência de impacto negativo na produção de peixes hospedeiros (Gomes et al., 2017). Entretanto, as lacunas referentes ao controle deste parasito são preocupantes.

Considerando o uso de plantas medicinais na aquicultura contra endohelmintíases, os óleos essenciais extraídos das plantas tem potencial para se tornarem uma nova geração de substâncias para uso na aquicultura, com sua incorporação na dieta ou em banhos terapêuticos (Reverter et al., 2014; Valladão et al., 2015; Chagas et al., 2017; Tavares-Dias, 2018). Óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis produzidos por organismos vivos e isolados apenas por meios físicos (pressão e destilação) de uma planta inteira ou parte de planta de origem taxonômica conhecida (Novak, 2010). Recebem essa denominação por terem aparência de óleos à temperatura ambiente (Barbosa, 2011).

Contra a acantocefalose causada por *N. buttnerae* em tambaqui, os estudos são escassos, embora haja resultados promissores com óleos essenciais de espécies de plantas medicinais cultivadas na Amazônia (Santos et al., 2018; Costa et al., 2020).

No entanto, mais esforços ainda são necessários considerando que no cenário atual: 1) esta doença parasitária ainda se configura como uma das maiores restrições impostas à produção do tambaqui no ambiente de cultivo; 2) é necessário o estabelecimento de protocolos que garantam a manutenção por maior tempo da viabilidade parasitária fora do hospedeiro e que garantam o suprimento de indivíduos

para ensaios laboratoriais; 3) o potencial anti-helmíntico dos compostos químicos derivados das plantas medicinais foi pouco explorado no Brasil diante da biodiversidade que existe; 4) alternativas precisam buscar soluções que viabilizem o acesso dos agentes terapêuticos aos helmintos, que tem com sítio de infecção o trato gastrointestinal e 5) pouco se conhece sobre os possíveis efeitos tóxicos dos tratamentos fitoterápicos na saúde dos hospedeiros, sendo fundamental o uso de bioindicadores hematológicos, bioquímicos, enzimáticos e morfológicos para tratamentos antiparasitários.

Este cenário justifica a presente pesquisa cujo objetivo geral foi contribuir com alternativas baseadas no uso de óleos essenciais obtidos de plantas medicinais para o controle da acantocefalose causada por *Neoechinorhynchus buttnerae* a partir da proposição de metodologias e estratégias *in vitro* e *in vivo* que reduzam a taxa de infecção sem interferir nas condições de saúde do tambaqui. Para tanto as seguintes hipóteses foram testadas:

- O meio essencial mínimo é eficaz para a manutenção da sobrevivência *in vitro* do endohelminto intestinal *Neoechinorhynchus buttnerae*;
- Óleos essenciais extraídos das espécies de plantas *Adenocalymna alliaceum*, *Allium sativum*, *Aloysia triphylla*, *Croton cajucara* (morfortipos branca e vermelha), *Curcuma longa*, *Lippia grata*, *Lippia origanoides*, *Lippia sidoides*, *Mentha arvensis*, *Ocimum gratissimum* e *Piper aduncum* são eficazes como antihelmínticos contra o acantocéfaló *Neoechinorhynchus buttnerae*, parasito de *Colossoma macropomum*;
- O tratamento *in vivo* da acantocefalose por *Neoechinorhynchus buttnerae* com óleos essenciais é eficaz para redução da infecção por este endohelminto intestinal em *Colossoma macropomum*;
- O tratamento *in vivo* da acantocefalose por *Neoechinorhynchus buttnerae* com óleos essenciais não altera os parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos em *Colossoma macropomum*.

Portanto, a presente tese está estruturada em três capítulos, cujos objetivos específicos de cada um foram:

- contribuir com a padronização de um protocolo para manutenção da viabilidade do *Neoechinorhynchus buttnerae* para os ensaios laboratoriais (Capítulo 1);

- realizar levantamento da composição química e do potencial antihelmíntico *in vitro* de óleos essenciais de 11 espécies de plantas medicinais cultivadas na Amazônia (Capítulo 2)

- verificar a eficácia do uso de óleos essenciais com maior eficácia antihelmíntica *in vitro*, adicionados à ração, na intensidade parasitária de *N. buttnerae* e avaliar os possíveis efeitos destes tratamentos nas respostas de desempenho zootécnico, hematológicas, bioquímicas, enzimáticas e morfológicas de *Colossoma macropomum* (Capítulo 3).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. S. et al. Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1689-1698, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5840-8>.

ANDRADE, S. M. S.; MALTA, J. C. O. Parasite fauna monitoring of matrinxã *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) raised in an intensive husbandry system in a stream channel in the state of Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 4, p. 1123-1132, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842006000600020>.

BARBOSA, D.B.M. Estudo da atividade antifúngica da associação do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela) com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Aspergillus*. Tese de Doutorado, 2011.

CHAGAS, E. C. et al. Endoparasitários na aquicultura. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C.; HEINZMANN, B. M.; CUNHA, M. A. Endoparasitários na aquicultura. 1ed.Santa Maria, RS: Editora da UFSM, 2017, p. 85.

CHAGAS, E. C. et al. *Neoechinorhynchus buttnerae* parasitic infection in tambaqui (*Colossoma macropomum*) on fish farms in the state of Amazonas. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 45, n. 2, p. 1-6, 2019. DOI: 10.20950/1678-2305.2019.45.2.499.

CHAGAS, E. C.; MACIEL, P. O.; AQUINO-PEREIRA, S. L. Infecções por acantocéfalos: um problema para a produção de peixes. **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**, 1ed.São Carlos: Pedro & João Editores, v. 1, p. 305-328, 2015.

COSTA, C. M. S. et al. In vitro culture of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae): Influence of temperature and culture media. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 562-569, 2018. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180079>.

DE PÁDUA, S. B. et al. Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1171-1174, 2013. DOI:10.1590/S0100-204X2013000800056.

FUJIMOTO, R. Y. et al. Fauna parasitária e relação parasito-hospedeiro de tambaquis criados na região do Baixo São Francisco, nordeste do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 563-570, 2019. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10306>.

GOLVAN, Y. J. Acanthocéphales d'Amazonie. Redescription d'*Oligacanthorhynchus iheringi* Travassos 1916 et description de *Neoechinorhynchus buttnerae* n. sp. (Neoacanthocephala-Neoechinorhynchidae). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 31, n. 5-6, p. 500-524, 1956.

GOMES, A. L. S. et al. The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) outbreaks on productive and economic performance of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), reared in ponds. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 45, n. 2, p. 496-500, 2017. <http://dx.doi.org/10.3856/vol45-issue2-fulltext-25>.

KENNEDY, C. R. Ecology of the Acanthocephala. Cambridge University Press, New York, USA, p. 249, 2006.

LOURENÇO, F. S. et al. Ocorrência de *Neoechinorhynchus* (Neoechinorhynchus) *buttnerae* Golvan, 1956 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) em *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Serrasalminidae) provenientes de uma piscicultura da Amazônia brasileira. **Folia Amazônica**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2017. <https://doi.org/10.24841/fa.v26i1.414>.

LOURENÇO, F. S.; MOREY, G. A. M.; MALTA, J. C. O. The development of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) in its intermediate host *Cypridopsis vidua* in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 63, n. 2, p. 354-359, 2018. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0040>.

MALTA, J.C.O., ANDRADE, S.M.S., AQUINO-PEREIRA, S.L., TAVARES-DIAS, M., VARELLA, A.M. Parasitos do matrinxã *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) na Amazônia central. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). Manejo e Sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, p. 425-437, 2009.

MALTA, J. C. O. et al. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia central. **Acta Amazonica**, v. 31, n. 1, p. 133-143, 2001. <https://doi.org/10.1590/1809-43922001311143>.

MARINHO, R. G. B.; TAVARES-DIAS, M.; DIAS-GRIGÓRIO, M. K. R.; NEVES, L. R.; YOSHIOKA, E. T. O.; BOIJINK, C. L.; TAKEMOTO, R. M. Helminthes and protozoan of farmed pirarucu (*Arapaima gigas*) in eastern Amazon and host-parasite relationship. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1192-1202, 2013.

MARTINS, M. L.; MARCHIORI, N.; NUNES, G.; RODRIGUES, M. P. First record of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae) from channel catfish,

Ictalurus punctatus cultivated in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 637-44, 2010.

MATOS, L. V. et al. Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Collossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. **Parasitology Research**, v. 116, n. 3, p. 1029-1037, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5384-3>.

MOREIRA, C.B. et al. Outbreak of mortality among cage-reared cobia (*Rachycentron canadum*) associated with parasitism. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 588-591, 2013.

NICKOL, B. B. Phylum Acanthocephala. IN: WOO PTK (ed) **Fish diseases and disorders, second edition: protozoan and metazoan infections**, vol I. CAB International, Wallingford, p. 444-465, 2006.

NOVAK, J.; BAHOO, L.; MITTERGGER, U.; FRANZ, C. Composition of individual essential oil glands of savory (*Satureja hortensis* L., Lamiaceae) from Syria. **Flavour Fragrances Journal**, v. 21, p.731-734, 2006.

OLIVEIRA, M. I. B. et al. The digestive tube of *Piaractus brachypomus*: gross morphology, histology/histochemistry of the mucosal layer and the effects of parasitism by *Neoechinorhynchus* sp. **Journal of Fish Biology**, v. 94, n. 4, p. 648-659, 2019. <https://doi.org/10.1111/jfb.13934>.

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

SALARO, R. E. G. Atividade *in vitro* de óleos essenciais contra *Neoechinorhynchus buttnerae* de tambaqui e seus efeitos no hospedeiro. 2018. Available from URL: <http://hdl.handle.net/11449/154582>.

SANIL, N. K.; ASOKAN, P. K.; JOHN, L. & VIJAYAN, K. K. Pathological manifestations of the acanthocephalan parasite, *Tenuiproboscis* sp. in the mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) (Forsskål, 1775), a candidate species for aquaculture from Southern India. **Aquaculture**, v. 310 (3-4), p. 259-266, 2010.

SANIL, N. K. et al. Pathological manifestations of the acanthocephalan parasite, *Tenuiproboscis* sp. in the mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) (Forsskål, 1775), a candidate species for aquaculture from Southern India. **Aquaculture**, v. 310, n. 3-4, p. 259-266, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.027>.

SANTOS, C. P. et al. Acanthocephala. In: PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. **Parasitologia. Peixes de Água Doce**. Maringá, Eduem, p. 353-370, 2013.

SANTOS, W. B. et al. *In vitro* efficacy of essential oils of *Piperaceae* species in the control of acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae*. **Revista Brasileira de**

Higiene e Sanidade Animal, v. 12, n. 4, p. 460-469, 2018. DOI: 10.5935/1981-2965.20180042.

SILVA R.M. et al. Parasitic fauna in hybrid tambacu from fish farms. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1049-1057, 2013.

SILVA, M. T. et al. Helminth community structure of *Arapaima gigas* in semi-intensive and intensive fish farming systems in the southwestern Brazilian Amazon. **Neotropical Helminthology**, v. 10, n. 2, p. 219-231, 2016.

SOLER-JIMÉNEZ et al. Helminth parasites of finfish commercial aquaculture in Latin America. **Journal of Helminthology**, v. 91(2), p. 110-136, 2017.

SOUZA, D. C. M; SANTOS, M. C.; CHAGAS, E. C. Immune response of teleost fish to helminth parasite infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 533-547, 2019. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019080>.

TARASCHEWSKI, H. Host-parasite interactions in Acanthocephala: A morphological approach. **Advances in parasitology**, v. 46, p. 1-179, 2000. DOI: 10.1016/s0065-308x(00)46008-2.

TAVARES-DIAS, M. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites: Review. **Aquatic Living Resources**, v. 31, p. 13. 2018.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 913-918, 2017.

VALLADÃO, G. M. R. et al. *Trichodina heterodentata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host-parasite relationship study. **Parasitology**, v. 141, p. 662-669, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182013001480>.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, n. 5, p.417-428, 2015. <https://doi.org/10.1111/jvp.12202>.

VALLADÃO, G. M. R. et al. Challenges in the control of acanthocephalosis in aquaculture: special emphasis on *Neoechinorhynchus buttnerae*. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1360-1372, 2020. <https://doi.org/10.1111/raq.12386>.

Capítulo 1

Protocolo para manutenção in vitro de Neoechinorhynchus buttnerae, um acantocéfalo de Colossoma macropomum

Artigo a ser submetido à revista: Diseases of Aquatic Organisms

Protocolo para manutenção in vitro de Neoechinorhynchus buttnerae, um acantocéfalo de Colossoma macropomum

Maria I. B. de Oliveira^{1,2}; Cláudia Majolo³; Fernanda de A. Sebastião³, Franmir R. Brandão³; Edsandra C. Chagas^{3,1*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, 69067-005, Manaus, AM, Brasil

²Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, 69067-005, Manaus, AM, Brasil

³Embrapa Amazônia Ocidental, AM-010, Km 29, Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM, Brasil.

*Corresponding author: edsandra.chagas@embrapa.br

Resumo

Neoechinorhynchus buttnerae (Acanthocephala) é um parasita encontrado no intestino do tambaqui *Colossoma macropomum* e surtos de infecção por este parasito tem comprometido a produção na piscicultura, especialmente na região norte do Brasil. O presente estudo avaliou o período de sobrevivência *in vitro* de *N. buttnerae* no meio essencial mínimo de Eagle (MEME), sob diferentes metodologias de manutenção. Para tanto, três ensaios foram realizados para avaliar se as variáveis temperatura, suplementação com antibióticos e substituição/não substituição do meio nutriente influenciariam na sobrevivência, indicada pela motilidade e morfologia dos acantocéfalos. Os resultados da análise de Kaplan-Meier indicaram que o uso de MEME suplementado com penicilina e estreptomicina e trocado a cada dois dias, prolongou significativamente a sobrevivência do parasito quando mantido a uma temperatura entre 24 e 28 °C. Por conseguinte, este estudo descreve um protocolo

alternativo para a manutenção de espécimes de *N. buttnerae* fora do hospedeiro e assegura uma maior confiabilidade em testes *in vitro* futuros com anti-helmínticos visando o controle da acantocefalose.

PALAVRAS-CHAVE: Acanthocephala, meio essencial mínimo, endoparasito, viabilidade.

Abstract

Neoechinorhynchus buttnerae (Acanthocephala) is a parasite found in the intestine of the tambaqui *Colossoma macropomum* and outbreaks of infection by this parasite have compromised production in fish farming, especially in northern Brazil. The present study evaluated the *in vitro* survival period of *N. buttnerae* in the minimum essential medium of Eagle (EMEM), under different maintenance methodologies. For this purpose, three trials were performed to assess whether the variables temperature, antibiotic supplementation and nutrient replacement/non-substitution would influence survival, indicated by the motility and morphology of acanthocephalans. The results of Kaplan-Meier's analysis indicated that the use of EMEM supplemented with penicillin and streptomycin and exchanged every two days significantly prolonged the parasite survival when kept at a temperature between 24 and 28 °C. Therefore, this study describes an alternative protocol for maintain *N. buttnerae* specimens out of the host and ensures greater reliability in future *in vitro* tests with anthelmintics for acantocephalosis control.

KEY WORDS: Acanthocephala, minimal essential medium, endoparasite, viability.

1. INTRODUÇÃO

Acantocefalose é uma doença causada pelo parasito *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan 1956 é que atualmente atualmente representa um entrave significativa no cultivo de peixes na região Norte do Brasil (Silva-Gomes et al. 2017, Pereira & Morey 2018, Valladão et al. 2019). Essa doença ocorre principalmente no *Colossoma macropomum* a espécie de peixe nativo mais produzida no país (Peixe BR 2020). Em altas taxas de infecção, *N. buttnerae* causa danos teciduais intestinais e ao atingir as vilosidades, prejudica a absorção de nutrientes no hospedeiro. Dessa

forma, há comprometimento da qualidade dos juvenis (De Matos et al. 2017, Aguiar et al. 2018) e da produtividade de *C. macropomum* (Silva-Gomes et al. 2017).

Para o estabelecimento de protocolos de tratamento deste endoparasito uma etapa inicial é realizar um screening de potenciais anti-helmínticos a partir de ensaios *in vitro* sobre a viabilidade de parasitos, após exposição aos fármacos por um determinado tempo. Nessas condições *in vitro*, uma exigência importante é que os parasitos sejam mantidos vivos fora do hospedeiro por um período mínimo necessário para validar os efeitos dos agentes terapêuticos, sejam eles sintéticos ou naturais, sobre a viabilidade dos parasitos expostos (Ahmed 2014). Assim, a verificação prévia da longevidade e da viabilidade dos parasitos sem influência dos fatores externos são essenciais para determinar os requisitos ideais *in vitro* e monitorar os efeitos da exposição aos diferentes fármacos (Scare et al. 2019).

A escolha do meio nutriente para manutenção dos parasitos é um passo essencial nos ensaios (Sangmaneedet & Smith 2000). Para tanto, devem ser levadas em consideração as exigências nutricionais de cada espécie de organismo testado. Meios quimicamente definidos contendo aminoácidos, vitaminas e outros metabólitos essenciais para o crescimento de linhagens de células animais têm sido empregados para a manutenção ou cultivo *in vitro* de parasitos helmintos (Ahmed 2014). Adicionalmente, a incorporação de antibióticos nos meios de manutenção representa uma alternativa asséptica para a condução adequada dos ensaios *in vitro* com anti-helmínticos (Yasuraoka et al. 2003).

O meio essencial mínimo (MEM) tem sido usado com sucesso na manutenção *in vitro* de espécies de helmintos Cestoda (Bucur et al. 2019), Trematoda (Hardy-Smith et al. 2012, Uddin et al. 2012), Nematoda (Scare et al. 2019, Heredia et al. 2018, Zofou et al. 2018, Njouendou et al. 2017) e Acantocephala (Harms 1965, Taraschewisk 1990) ao longo dos anos. Todavia, são escassos os estudos sobre viabilidade de *N. buttnerae* fora do hospedeiro e de metodologias padronizadas *in vitro* para avaliação de anti-helmínticos (Valladão et al. 2019). Assim, considerando-se a importância de se encontrar substâncias que controlem a acantocéfaloze na criação de tabaquis no Brasil, o presente estudo teve como objetivo determinar o tempo de sobrevivência de *N. buttnerae* no meio essencial mínimo de Eagle (MEME) suplementado com os antibióticos penicilina e estreptomicina, sob diferentes condições de manutenção e temperatura.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1 Aquisição dos peixes e parasitos

Vinte espécimes de *C. macropomum* ($19,3 \pm 0,12$ cm e $268,7 \pm 6,17$ g) naturalmente infectados por *N. buttnerae* ($634,1 \pm 129,7$ de intensidade média) foram adquiridos em piscicultura comercial com registro de ocorrência da acantocefalose e transportados para o setor de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, Brasil). Os peixes foram mantidos em tanques de fibras de vidro com capacidade de 1.000 litros, com aeração constante e aquecimento, durante 30 dias.

Após anestesia (benzocaína, 250 mg/L) e eutanásia dos peixes por secção da medula espinal, usando protocolo de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA 2018 e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Amazônia Ocidental (Protocolo N° 03/2018), os intestinos dos peixes foram removidos e dissecados sendo os helmintos retirados do lúmen intestinal, transferidos para placas de Petri contendo soro fisiológico (0,9%) e visualizados com o auxílio de um estereomicroscópio (Leica, EZ4). O acesso ao patrimônio genético (peixes e parasitos) foi regularizado por meio do cadastro AB1F0FA, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), Ministério do Meio Ambiente (MMA).

2.2 Ensaios de viabilidade

Em laboratório, após duas lavagens em solução tampão fosfato (PBS), os helmintos vivos foram transferidos para placas de Petri contendo 5 mL do meio essencial mínimo/MEM Eagle (Sigma-Aldrich, UK), suplementado com 100 U/mL penicilina (Life Technologies) e 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies).

Três tratamentos foram realizados: no primeiro, não houve a suplementação com antibióticos (SA) e nem reposição do meio nutriente (SR), sendo o controle negativo: SASR [--]; no segundo tratamento, o meio foi suplementado com antibióticos (CA) e não houve reposição do meio (SR), configurando o tratamento: CASR [+]. No terceiro tratamento, tanto a suplementação com antibióticos (CA) quanto a reposição do meio (CR) a cada dois dias foram efetuados: tratamento CACR[++]. Em cada ensaio, as placas de Petri contendo os parasitos ($n = 10$) foram incubadas em cinco temperaturas: 24°C, 26°C, 28°C, 30°C e 32°C, com três repetições cada.

A análise de sobrevivência foi realizada a cada 24 horas até que todos os

parasitos morressem. Parasitos considerados mortos foram aqueles que apresentaram ausência de qualquer motilidade, mesmo após estímulo (Oliveira et al., 2019). Estes foram descartados, mantendo-se nas placas somente os parasitos vivos, os quais apresentavam movimentos rápidos ou lentos de parte do corpo ou do corpo inteiro, movimentos discretos da probóscide ou do fluido corporal, com movimentação dos órgãos internos. visando associar descritores morfológicos às mudanças na motilidade com o tempo, alterações corporais nos helmintos foram registradas ao longo dos ensaios: mudanças macroscópicas no tegumento, mudanças na coloração, inchaço ou desidratação corporal, deterioração dos órgãos internos e perda da integridade do corpo.

2.3 Análises estatísticas

O tempo de sobrevivência (dias) foi determinado a partir do início dos experimentos até a ocorrência da morte de cada parasito. Este fator foi utilizado na análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. As curvas de sobrevivência obtidas em cada tratamento e entre a mesma temperatura de tratamentos diferentes foram estatisticamente comparadas pelo teste log-rank, considerando significativo quando $p < 0,001$. A análise estatística foi efetuada com auxílio do programa Prism versão 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

3. RESULTADOS

3.1 Viabilidade de *Neoechinorhynchus buttnerae*: motilidade e morfologia

Três diferentes padrões morfológicos e de motilidade foram observados nos espécimes de *N. buttnerae* deste estudo: 1) parasitos com enrolamento da porção posterior do metasoma, com enrugamento característico do tegumento e transparência do corpo com fácil visualização do pseudoceloma e dos órgãos internos, em especial os órgãos reprodutivos (Figura 1A). Estes apresentavam movimentos rápidos do corpo todo, ou de partes do corpo, eversão da probóscide ou movimentos dos fluidos no pseudoceloma, naturalmente ou sob leve estímulo; 2) Parasitos parcial ou totalmente inchados com distensão parcial ou total do corpo e perda do enrugamento do tegumento (Figura 1B). Neste caso, movimentos lentos de partes do corpo somente sob estímulo e ausência de eversão da probóscide foram observados e; 3) parasitos escurecidos, totalmente distendidos, inchados, com perda

do enrugamento do tegumento, ou desidratados e friáveis, com deterioração parcial ou total dos órgãos internos ou, deterioração do organismo inteiro (Figura 1C). Neste caso foi observada a ausência de motilidade, mesmo sob estímulos; estes parasitos foram considerados inviáveis e no final do tempo de sobrevivência.

3.2 Tempo de sobrevivência de *Neoechinorhynchus buttnerae* em diferentes condições de manutenção e temperatura

Nos ensaios sem a suplementação do meio nutriente com antibióticos e sem a substituição do meio (SASR [--]), o tempo máximo de sobrevivência de *N. buttnerae* foi de 20 dias (Figura 2A). Com a suplementação do meio com antibióticos, porém ainda sem a troca do meio (CASR [+]), esse tempo máximo de sobrevivência permaneceu o mesmo (Figura 2B). Já com a suplementação com antibióticos e com substituição do meio a cada dois dias (CACR [++]), o tempo máximo de sobrevivência dos acantocéfalos aumentou para 42 dias (Figura 2C).

No primeiro tratamento (SASR [--]), a amplitude do tempo de sobrevivência mediana (o tempo em que a fração de sobrevivência é igual a 50%) foi de 4 a 7 dias. Nas temperaturas de 24 °C, 26 °C e 28 °C, o tempo de sobrevivência de 100% dos dos acantocéfalos foi de 24 horas. Nas temperaturas de 30 °C e 32 °C esse tempo foi de menos de 24 horas e o percentual de sobrevivência de *N. buttnerae* na temperatura de 32 °C foi significativamente menor que nas demais temperaturas testadas ($p < 0,001$). Não houve diferença no percentual de sobrevivência entre 24, 26 e 28 °C (Tabela 2).

No segundo tratamento, com a suplementação do meio com antibióticos, porém sem a substituição do meio a cada dois dias, (CASR [+]), a amplitude do tempo de sobrevivência mediana também foi de 4 a 7 dias no entanto, aumentou para dois dias o tempo de sobrevivência de 100% dos acantocéfalos nas temperaturas de 24 °C e 26 °C. Nas maiores temperaturas, esse tempo de sobrevida foi menor que 24 h (Tabela 2). Nas menores temperaturas de 24 e 26 °C, o percentual de sobrevivência foi significativamente maior ($p < 0,001$) que nas maiores temperaturas testadas (30 °C e 32 °C). Não houve diferença significativa ($p > 0,001$) no tempo de sobrevivência dos endoparasitos entre as temperaturas de 26 e 28 °C (Tabela 2).

No terceiro tratamento, com a suplementação do meio com antibióticos e com a substituição do meio a cada dois dias (CACR [+]), os maiores valores foram

registrados para a amplitude do tempo mediano de sobrevivência, que foi de 6 a 21 dias; o tempo máximo de sobrevivência de 100% dos helmintos, foi de dois dias, nas temperaturas de 24 °C e 26 °C e de menos de 24 horas nas demais temperaturas (Tabela 3).

3.3. O efeito da temperatura no tempo de sobrevivência de *Neoechinorhynchus buttnerae* entre os tratamentos

Comparando-se controle negativo, SASR [--], com o tratamento, com suplementação de antibióticos e sem a reposição do MEME (CASR [+]), não houve diferença nos percentuais máximos de sobrevivência dos helmintos em nenhuma das temperaturas testadas. Valores significativamente maiores ($p < 0,001$) no tempo de sobrevivência foram observados quando houve tanto a substituição do meio, quanto a suplementação com antibióticos (CACR [++]), em comparação com o controle negativo, nas temperaturas de 24, 26, 28 e 32 °C. (Tabela 4). Em 30 e 32°C, esse percentual de sobrevivência não diferiu ($p > 0,001$) entre os tratamentos. Ao padronizar a suplementação do meio com antibiótico nos tratamentos CASR [+] e CACR [++], um percentual significativamente maior ($p < 0,001$) de sobrevivência foi observado com o procedimento de reposição do meio MEME, nas menores temperaturas testadas 24, 26 e 28 °C. Na temperatura de 30 e 32 °C o percentual de sobrevivência não diferiu ($p > 0,001$) entre os tratamentos (Tabela 4).

4. DISCUSSÃO

Nos estudos sobre manutenção e cultivo *in vitro* de helmintos, a interpretação dos resultados é feita a partir da quantificação da viabilidade dos parasitos. Em geral, o principal parâmetro avaliado é a inspeção visual dos movimentos corporais ao longo do tempo. Essa variação na motilidade foi o parâmetro utilizado na avaliação *in vitro* de helmintos Trematoda (Uddin et al., 2012), Nematoda (Chapman 1994; Njouendou et al. 2017; Zofou et al. 2018; Scare et al. 2019) e Acantocephala (Costa et al. 2018).

No presente estudo, além da motilidade, o enrolamento em espiral da parte posterior do corpo de *N. buttnerae*, a presença de rugas no tegumento, a integridade dos órgãos internos e os movimentos corporais distinguiram claramente os acantocéfalos vivos dos mortos, os quais apresentaram-se escurecidos, distendidos

pelo inchaço corporal, ou desidratados e friáveis, com sinais de deterioração. Estes descritores morfológicos associados à inviabilidade foram similares aos descritos por Costa et al (2018) para *N. Buttnerae* após manutenção nos meios RPMI 1640 e Leibowitz. Também com *Acantocephala*, Dunagan (1962) observou que independentemente do período em que os parasitos permaneceram móveis e dos meios de manutenção utilizados, eles foram afetados da mesma maneira, ou seja, com inchaço gradual seguido de imobilização. A observação das características morfológicas distintivas entre os parasitos viáveis e inviáveis é uma ferramenta útil para a validação dos resultados em ensaios *in vitro* em especial com produtos derivados de plantas medicinais cultivadas na Amazônia, em que um possível efeito anestésico pode levar a imobilidade temporária e portanto a erros na interpretação da viabilidade.

O meio essencial mínimo (MEM) é composto por uma mistura de sais orgânicos e inorgânicos, enriquecido com aminoácidos, vitaminas, glucose e outros componentes essenciais para o crescimento celular. Diferentes formulações de MEM, como Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e Gibco Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) foram avaliadas para manutenção e tempo de sobrevivência de helmintos (Yao & Assaiama 2017). Em geral, bons resultados foram alcançados com a manutenção da viabilidade *in vitro* a curto e longo prazos, em ensaios com helmintos Nematoda na fase larval (Njouendou et al. 2017, Heredia et al. 2018, Zofou et al. 2018) e adultos (Townson 1986), com Trematoda adultos (Uddin et al. 2012) e com Cestoda na fase larval (Spiliot & Brem 2009). O meio MEME foi utilizado no protocolo de avaliação anti-helmíntica *in vitro* em duas espécies de acantocéfalos, *Neoechinorhynchus rutili* e *Echinorhynchus truttae* (Taraschewski et al. 1990); porém, sem estudo prévio do tempo de capacidade do meio em manter os parasitos vivos fora do hospedeiro o que garante, de acordo com Valadão et al (2019), que fatores externos não possam influenciar a longevidade durante a avaliação de uma substância terapêutica. Nossos resultados comprovaram a eficácia do meio MEME na manutenção *in vitro* de *N. buttnerae* com destaque para 100% de sobrevivência dos acantocéfalos adultos durante dois dias nas temperaturas entre 24 e 28 °C.

Conforme relataram Yao & Asayama (2017), contaminações com substâncias não identificadas podem ocorrer no meio de cultivo e afetar os resultados

de viabilidade. No presente trabalho, a suplementação do meio MEME com os antibióticos penicilina e estreptomicina somado a substituição do meio nas unidades experimentais a cada dois dias aumentou o tempo de sobrevivência *in vitro* de *N. buttnerae*, para até 42 dias, quando incubados a 24°C. Os antibióticos penicilina e estreptomicina são frequentemente usados no controle do crescimento de bactérias (Pawar et al. 2019, Ulkhaq et al. 2020). A combinação de penicilina e estreptomicina é promissora, visto que a penicilina tem mostrado maior eficácia contra bactérias Gram-positivas, enquanto a estreptomicina é mais ativa contra bactérias Gram-negativas aeróbias (Madigan et al., 2016). Ambos antibióticos atuam inibindo a biosíntese da parede celular bacteriana, a iniciação da síntese da cadeia proteica ou produzindo proteínas defeituosas (Trabulsi 2008).

A substituição do meio de cultivo dos helmintos é justificada pela mudança de coloração observada nas placas (Njouendou et al. 2017) e para a manutenção das propriedades ideais do meio (Costa et al. 2018). No entanto, o efeito da reposição ou não do meio de cultivo durante os ensaios *in vitro* é raramente avaliada. Nicholas & Grigg (1965), cultivando *in vitro* acantocéfalos *Moliniformis dubius*, relataram que mesmo com presença de PBS no MEME, os helmintos produziram ácido em 24 horas de exposição, provavelmente segundo os autores devido a liberação de produtos residuais ácidos. A escassez de nutrientes e/ou o aumento de produtos residuais liberados de células vivas ou mortas são fatores que podem contribuir para a perda da viabilidade (Sangmaneedet & Smith 2000). A não reposição do meio MEME interferiu na viabilidade de *N. buttnerae* nas temperaturas de 24, 26 e 28°C e o tempo de sobrevivência dos parasitos foi reduzido pela metade. Estudos futuros sobre os principais produtos finais do metabolismo excretor do *N. buttnerae* poderão caracterizar a produção de ácidos pelo parasito e se a troca do meio adotada no presente trabalho estaria portanto compensando uma queda significativa de pH e mantendo os parasitos viáveis. Relatos anteriores indicam a importância de determinar o pH ótimo para manter a viabilidade dos parasitos. A gama de pH ótimo para salmões Hexamita isolados dos peixes de água fria *Oncorhynchus mykiss* era de 7,5 a 8,0 (Buchmann & Uldal 1996). O *Spironucleus vortens* isolado de *Pterophyllum scalare* (indígena do rio Amazonas) tinha a gama de pH ótimo de 6,5 a 7,5 para crescimento (Sangmaneedet & Smith 2000).

Todavia, a renovação ou não do meio não fez diferença no tempo de vida de *N. buttnerae* mantidos em temperaturas de 30 e 32°C no presente trabalho, o que

sugere que a própria temperatura elevada limitou a sobrevivência dos parasitos. O impacto da temperatura foi avaliado em poucos estudos de sobrevivência *in vitro* com helmintos (Hamers et al. 1991, Maya et al. 2010). Costa et al. (2018) observaram que a temperatura teve significativa influência na integridade da morfologia em *N. buttnerae*, e que para a manutenção *in vitro* por mais tempo, a temperatura de 24°C é a mais adequada. No presente estudo, a viabilidade de *N. buttnerae* foi observada em espectros de temperatura mais amplo, de 24 a 28 °C, e corrobora com os resultados de Costa et al. (2018) de quanto menor a temperatura, maior o tempo de sobrevivência dos parasitos. Além disso, a desidratação com deterioração parcial ou total do corpo do parasito foi observada nas maiores temperaturas testadas, 30 e 32 °C, onde menor tempo de sobrevivência foi observado. Por outro lado, a temperatura foi considerada o principal fator na morte de *Spiroucleus vortens*, um parasito intestinal de peixes, em culturas mantidas a 34° C ou mais (Sangmaneedet & Smith 2000).

A influência da temperatura da água sobre a abundância de helmintos Acantocephala em peixes, no ambiente natural é escassamente registrada na literatura. *Pomphorhynchus bubocolli* exibiu acentuada sazonalidade nos níveis de infecção, sendo maior nas temperaturas mais baixas no inverno na América do Norte (Gleason, 1987). Apesar de não haver estudo sobre a relação entre a temperatura e os níveis de infecção por *N. buttnerae* em tambaqui *in vivo*, uma hipótese importante a ser testada, a maior sobrevivência *in vitro* obtida em temperaturas mais baixas, de 24 °C a 28°C, está dentro da faixa de temperatura mais adequada para o cultivo da espécie que é entre 25 °C a 27 °C (Woynárovich & Anrooy 2019).

O presente estudo mostrou os resultados promissores de um método viável para avaliação da viabilidade de *N. buttnerae* usando MEME suplementado com 2 antibióticos, em diferentes temperaturas de manutenção. Os resultados são promissores, demonstrando que em temperaturas de 24-26°C é possível avaliar a sobrevivência do parasito, com a reposição do MEME a cada dois dias, por um período superior a 30 dias. O método pode ser aplicado em estudos futuros para avaliar a ação de anti-helmínticos contra *N. buttnerae*. Considerando a problemática da acantocefalose por *N. buttnerae* no cultivo do tambaqui e a necessidade de estratégias efetivas de controle desta parasitose, contribuimos no presente estudo com um protocolo aplicável para manutenção dos espécimes de *N. buttnerae* fora do

hospedeiro, garantindo mais confiabilidade nos resultados de testes com anti-helmínticos que em estudos futuros poderão compor o protocolo de tratamento para estas parasitose, que hoje é o principal entrave na criação do tambaqui e seus híbridos.

5. CONCLUSÕES

A suplementação do meio MEM na formulação Eagle's com penicilina e estreptomicina e a substituição desse meio a cada dois dias prolongou o tempo de sobrevivência de *N. buttnerae* de 20 para 42 dias, quando mantidos a 24 °C, de 20 para 34 dias a 28 °C e de 13 para 28 dias, a 28 °C. As temperaturas de 30 e 32 °C não favoreceram a manutenção dos parasitos independente da substituição do meio de cultivo. Portanto, sugere-se um protocolo alternativo para manutenção *in vitro* dos espécimes de *N. buttnerae in vitro* constituído de MEME, suplementado com 100 U mL⁻¹ penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina, incubação de 24 °C e substituição do meio a cada dois dias. Este protocolo poderá ser utilizado em futuros estudos visando a avaliação de anti-helmínticos para o controle de *N. buttnerae*.

Agradecimentos. À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (MP2 02.13.09.003.00.00) e à Fundação de Pesquisa da Amazônia - FAPEAM (Universal Amazonas 002/2018) pelo apoio financeiro. Aos assistentes Edson Paiva Afonso e José Marconde da Costa e Silva, da Embrapa Amazônia Ocidental, pela assistência técnica durante os experimentos. À FAPEAM pelo apoio financeiro relativo à tradução do manuscrito (PAPAC 005/2019, Processo nº 062.00847.2019).

REFERÊNCIAS

Aguiar LS, de Oliveira MIB, de Matos LV, Gomes ALS, da Costa JI, da Silva GS (2018) Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Parasitol Res 117:1689-1698

Ahmed NH (2014) Cultivation of parasites. Trop Parasitol 4:80

- Awachie J (1965) The ecology of *Echinorhynchus truttae* Schrank, 1788 (Acanthocephala) in a trout stream in North Wales. *Parasitol* 55:747-762
- Bassleer G (1983) Disease prevention and control. Spirotrichus/Hexamita infection, hole-in-the-head. *Freshwater Marine Aquaria* 6:38-60
- Bratley J (1986) Life history and population biology of larval *Acanthocephalus lucii* (Acanthocephala: Echinorhynchidae) in the isopod *Asellus aquaticus*. *J Parasitol* 72:633-645
- Bratley J (1988) Life history and population biology of adult *Acanthocephalus lucii* (Acanthocephala: Echinorhynchidae). *J Parasitol* 74:72-80
- Brown A (1989) Seasonal dynamics of the acanthocephalan *Pomphorhynchm laevis* (Müller, 1776) in its intermediate and preferred definitive hosts. *J Fish Biol* 34:183-194
- Buchmann K, Uldal A (1996) Temperature, pH and bile dependent *in vitro* cultivation of *Hexamita salmonis* from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* intestine. *Dise Aquat Org* 24:169-172
- Bucur I, Gabriël S, Van Damme I, Dorny P, Johansen MV (2019) Survival of *Taenia saginata* eggs under different environmental conditions. *Vet Parasitol* 266:88-95
- Camp Jr JW, Huizinga HW (1980) Seasonal population interactions of *Acanthocephalus dirus* (Van Cleave 1931) in the creek chub, *Semotilus atromaculatus*, and isopod, *Asellus intermedius*. *J Parasitol* 66:299-304
- Chapman M, Hutchinson G, Cenac M, Klei T (1994) *In vitro* culture of equine strongylidae to the fourth larval stage in a cell-free medium. *J. Parasitol*:225-231
- Costa CMdS, Lima TBC, Cruz MGd, Almeida DV, Martins ML, Jerônimo GT (2018) *In vitro* culture of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae): Influence of temperature and culture media. *Vet Bras Parasitol Vet* 27:562-569
- de Matos LV, de Oliveira MIB, Gomes ALS, da Silva GS (2017) Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Collossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. *Parasitol Res* 116:1029-1037

- Dunagan T (1962) Studies on *in vitro* survival of Acanthocephala. Proc Helminthol Soc Wash 29:131-135
- Gleason LN (1987) Population dynamics of *Pomphorhynchus bulbocolli* in *Gammarus pseudolimnaeus*. J Parasitol 73:1099-1101
- Golvan YJ (1956) Acanthocéphales d'Amazonie. Redescription d'Oligacanthorhynchus iheringi Travassos 1916 et description de *Neoechinorhynchus buttnerae* n. sp. (Neoacanthocephala-Neoechinorhynchidae). Ann Parasitol Hum Comp 31:500-524
- Hamers R, Taraschewski H, Lehmann J, Mock D (1991) *In vitro* study on the impact of fish sera on the survival and fine structure of the eel-pathogenic acanthocephalan *Paratenuisentis ambiguus*. Parasitol Res 77:703-708
- Hardy-Smith P, Ellis D, Humphrey J, Evans M and others (2012) *In vitro* and *in vivo* efficacy of anthelmintic compounds against blood fluke (*Cardicola forsteri*). Aquaculture 334:39-44
- Harms CE (1965) *In vitro* cultivation of an acanthocephalan, *Octospinifer macilentis*. Exp Parasitol 17:41-45
- Heredia NS, Ávila AS, Velásquez LE (2018) *In vitro* culture of L₃ larvae of nematodes obtained from the African giant snail *Lissachatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) in Santa Fe de Antioquia. Biomédica 38:24-29
- Kennedy CR (2006) Ecology of the Acanthocephala, Vol. Cambridge University Press
- Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA (2016) Microbiologia de Brock-14^a Edição, Vol. Artmed Editora
- Maya C, Ortiz M, Jiménez B (2010) Viability of *Ascaris* and other helminth genera non larval eggs in different conditions of temperature, lime (pH) and humidity. Water Sci Technol 62:2616-2624
- Nicholas W, Grigg H (1965) The *in vitro* culture of *Moniliformis dubius* (Acanthocephala). Exp Parasitol 16:332-340
- Njouendou AJ, Ritter M, Ndongmo WPC, Kien CA and others (2017) Successful long-term maintenance of *Mansonella perstans* in an *in vitro* culture system. Parasit Vectors 10:1-6

Pawar HV, Tetteh J, Debrah P, Boateng JS (2019) Comparison of *in vitro* antibacterial activity of streptomycin-diclofenac loaded composite biomaterial dressings with commercial silver based antimicrobial wound dressings. *Int J Biol Macromol* 121:191-199

Peixe BR. 2020. Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixe BR, São Paulo

Pereira JN, Morey GAM (2018) First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacantocephala, Neochinorhynchidae) on *Colossoma macropomum* (Characidae) in a fish farm in Roraima, Brazil. *Acta Amaz* 48:42-45

Sangmaneedet S, Smith SA (2000) *In vitro* studies on optimal requirements for the growth of *Spiroucleus vortens*, an intestinal parasite of the freshwater angelfish. *Dis Aquat Org* 39:135-141

Scare J, Steuer A, Shaffer C, Slusarewicz P, Mousley A, Nielsen M (2019) Long live the worms: methods for maintaining and assessing the viability of intestinal stages of *Parascaris* spp. *in vitro*. *Parasitol* 146:685-693

Silva-Gomes AL, Gomes Coelho-Filho J, Viana-Silva W, Braga-Oliveira MI, Bernardino G, Costa JI (2017) The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) (Eoacanthocephala: Neochinorhynchidae) outbreaks on productive and economic performance of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), reared in ponds. *Lat Am J Aquat Res* 45:496-500

Taraschewski H, Mehlhorn H, Raether W (1990) Loperamid, an efficacious drug against fish-pathogenic acanthocephalans. *Parasitol Res* 76:619-623

Townson S, Connelly C, Muller R (1986) Optimization of culture conditions for the maintenance of *Onchocerca gutturosa* adult worms *in vitro*. *J Helminthol* 60:323-330

Uddin MH, Li S, Bae YM, Choi M-H, Hong S-T (2012) *In vitro* maintenance of *Clonorchis sinensis* adult worms. *Korean J Parasitol* 50:309

Ulkhay M, Budi D, Rahayu N (2020) The effect of temperature, salinity and antimicrobial agent on growth and viability of *Aeromonas hydrophila*. *Earth Environ. Sci* 441:012020

Valladão GMR, Gallani SU, Jerônimo GT, Seixas ATd (2019) Challenges in the control of acanthocephalosis in aquaculture: special emphasis on *Neoechinorhynchus buttnerae*. Rev Aquacult.

Woynárovich A, Van Anrooy R (2019) Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper: I-121

Yao T, Asayama Y (2017) Animal- cell culture media: History, characteristics, and current issues. Rep Med Biol 16:99-117

Yasuraoka K, Hata H (2003) *In vitro* cultivation of parasitic helminths. Prog Med Parasitol Jpn Tokyo: Meguro Parasitological Museum:211-226

Zofou D, Fombad FF, Gandjui NVT, Njouendou AJ and others (2018) Evaluation of *in vitro* culture systems for the maintenance of microfilariae and infective larvae of *Loa loa*. Parasit Vectors 11:275.

TABELAS E FIGURAS

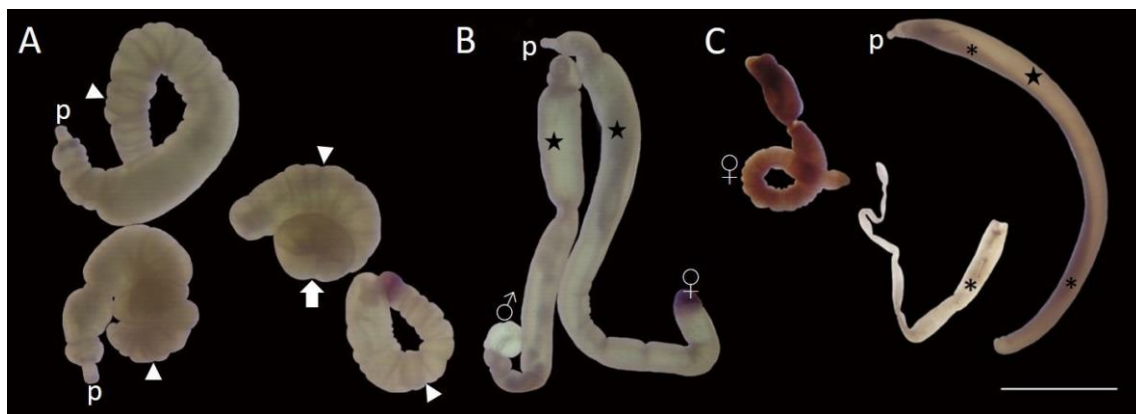


Figura 1. Padrões morfológicos observados em espécimes de *Neoechinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle (MEME) suplementado com antibióticos. A: parasitos vivos com enrolamento da porção posterior do metasoma (seta), enrugamento característico do tegumento (cabeças de seta) e a transparência do corpo com fácil visualização do pseudoceloma e dos órgãos internos. B: parasitos moribundos com inchaço corporal (estrela), perda do enrugamento do tegumento e sem eversão da probóscide (p) mesmo sob estímulo. C: parasitos mortos, escurecidos e distendidos, com inchaço corporal (estrela) com perda do enrugamento do tegumento, com deterioração dos órgãos internos (asterisco) ou desidratados e friáveis em deterioração. Barra: 1cm.

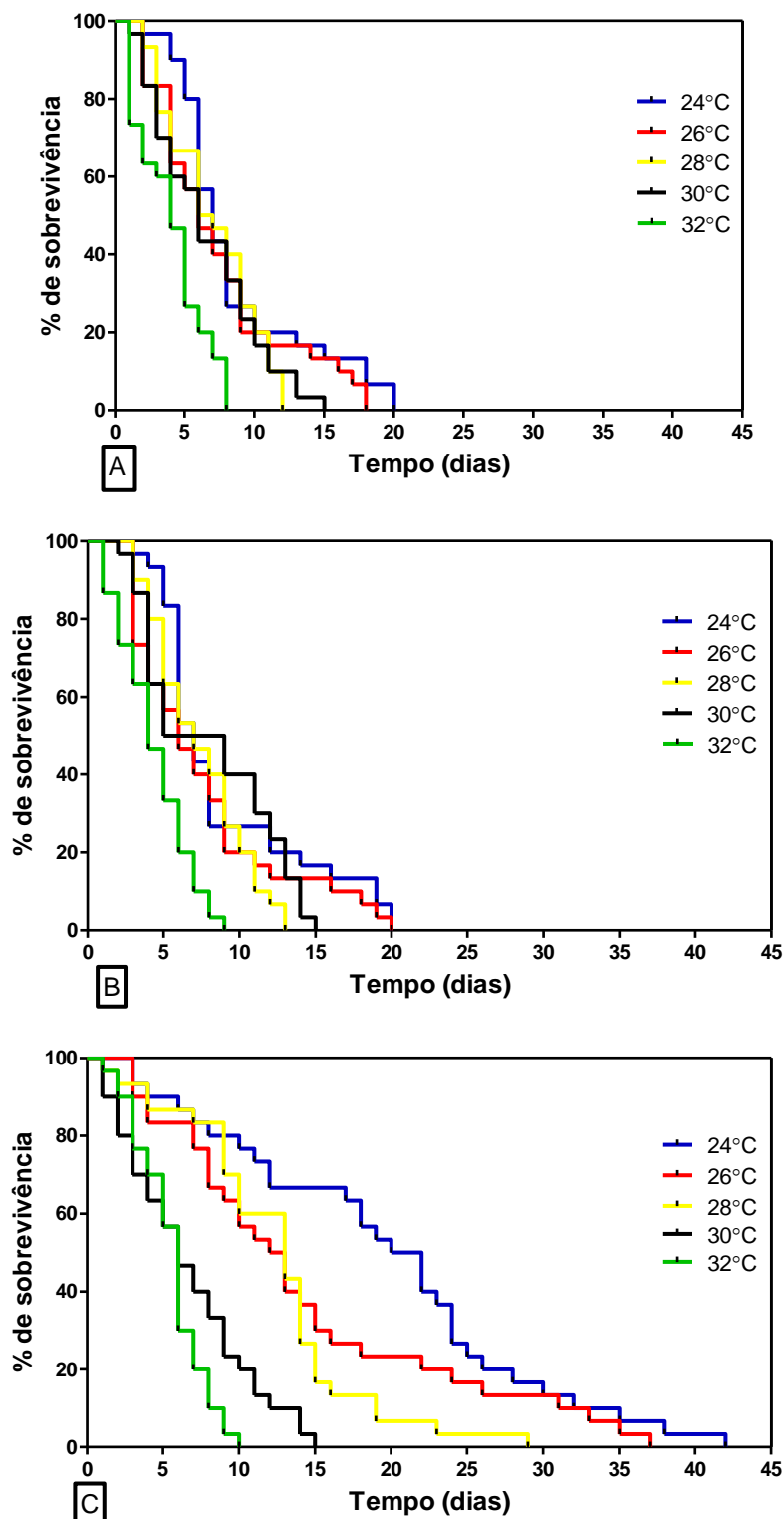


Figura 2. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier estimadas para *Neochinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle. A: meio sem suplementação com antibióticos e sem reposição (SASR [--]). B: meio suplementado com antibióticos e sem reposição do meio (CASR [+]). C: Meio suplementado com antibióticos e com reposição do meio a cada dois dias (CACR [++]).

Tabela 1. Período mediano, máximo e de 100% de sobrevivência, em dias, de *Neochinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle, sem suplementação com antibióticos e sem reposição do meio (SASR [--]) e comparação por teste de Log-Rank, das curvas de sobrevivência entre diferentes temperaturas. *indica diferença significativa ($P < 0,01$).

Temperatura	N	Período mediano de sobrevivência (dias)	Período máximo de sobrevivência (dias)	Período (dias) com 100% sobreviência	Comparação por Log-rank test das curvas de sobrevivência		
					Temperaturas testadas	Valores críticos para distribuição do chi-quadrado (χ^2)	p
24 °C	30	7	18	1	24 °C x 26°C	1,21	0,270
					24 °C x 28°C	1,61	0,204
26 °C	30	6	17	1	24 °C x 30°C	20,72	0,0001*
					24 °C x 32°C	18,15	0,0001*
28 °C	30	6.5	11	1	26 °C x 28°C	0,31	0,579
					26 °C x 30°C	0,99	0,319
30 °C	30	6	13	< 24h	26 °C x 32°C	11,18	0,0008*
					28 °C x 30°C	0,001	0,967
32 °C	30	4	7	< 24 h	28 °C x 32°C	14,83	0,0001*
					30 °C x 32°C	10,01	0,0016*

Tabela 2. Período mediano, máximo e de 100% de sobrevivência, em dias, do *Neochinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle, com suplementação com antibióticos e sem reposição do meio (CASR [+]) e comparação por teste de Log-Rank, das curvas de sobrevivência entre diferentes temperaturas. *indica diferença significativa ($p < 0,01$).

Temperatura	N	Período mediano de sobrevivência (dias)	Período máximo de sobrevivência (dias)	Período (dias) com 100% sobreviência	Comparação por Log-rank test das curvas de sobrevivência		
					Temperaturas testadas	Valores críticos para distribuição do chi-quadrado (χ^2)	p
24 °C	30	7	20	2	24 °C x 26°C	1,18	0,276
					24 °C x 28°C	2,35	0,126
26 °C	30	6	20	2	24 °C x 30°C	1,53	0,216
					24 °C x 32°C	19,15	<0,0001*
28 °C	30	7	13	2	26 °C x 28°C	0,072	0,788
					26 °C x 30°C	0,006	0,934
30 °C	30	7	15	1	26 °C x 32°C	10,02	0,0015*
					28 °C x 30°C	2,22	0,138
32 °C	30	4	9	< 24 h	28 °C x 32°C	15,88	<0,0001*
					30 °C x 32°C	14,94	0,0001*

Tabela 3. Período mediano, máximo e de 100% de sobrevivência, em dias, do *Neochinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle, com suplementação com antibióticos e com reposição do meio (CACR [++]) e comparação por teste de Log-Rank, das curvas de sobrevivência entre diferentes temperaturas; *indica diferença significativa (P<0,01).

Temperatura	N	Período mediano de sobrevivência (dias)	Período máximo de sobrevivência (dias)	Período (dias) com 100% sobrevivência	Comparação por Log-rank test das curvas de sobrevivência		
					Temperaturas testadas	Valores críticos para distribuição do chi-quadrado (χ^2)	p
24 °C	30	21	42	2	24 °C x 26 °C	2,95	0,0856
26 °C	30	12.5	34	2	24 °C x 28 °C	12,40	0,0004*
					24 °C x 30 °C	34,19	<0,0001*
28 °C	30	13	28	< 24 h	24 °C x 32 °C	41,25	<0,0001*
					26 °C x 28 °C	1,112	0,2908
30 °C	30	6	16	< 24 h	26 °C x 30 °C	16,53	<0,0001*
					26 °C x 32 °C	29,37	<0,0001*
32 °C	30	6	11	< 24 h	28 °C x 30 °C	18,06	<0,0001*
					28 °C x 32 °C	3,39	0,0656
					30 °C x 32 °C	14,94	0,0656

Tabela 4. Comparação por teste de Log-Rank, dos tempos de sobrevivência estimados para *Neochinorhynchus buttnerae* mantidos em meio essencial mínimo de Eagle (MEME), sem suplementação com antibióticos e sem reposição do meio (SASR [--]); suplementado com antibióticos e sem reposição do meio (CASR [+]) e suplementado com antibióticos e com reposição do meio (CACR [++]). Entre parênteses, os tempos máximos de sobrevivência. χ^2 :valores críticos para distribuição do chi-quadrado; *indica diferença significativa (p<0,01).

Temperatura	Tratamentos	CASR [+]		CACR [++]	
24 °C	SASR [--] (18)	χ^2 :0,044; p: 0,834	(20)	χ^2 :25,03; p <0,0001*	(42)
26 °C	SASR [--] (17)	χ^2 :10,90; p: 0,723	(20)	χ^2 :10,90; p: 0,0010*	(34)
28 °C	SASR [--] (11)	χ^2 :0,212; p: 0,645	(13)	χ^2 :24,82; p <0,0001*	(28)
30 °C	SASR [--] (13)	χ^2 : 2,399; p: 0,1214	(15)	χ^2 :0,002; p: 0,878	(16)
32 °C	SASR [--] (07)	χ^2 :0,575; p: 0,076	(09)	χ^2 :4,41; p: 0,035	(11)
24 °C	CASR [+]	-		χ^2 :23,42; p <0,0001*	(42)
26 °C	CASR [+]	-		χ^2 : 11,47; p <0,0007*	(34)
28 °C	CASR [+]	-		χ^2 :22,23; p: <0,0001*	(28)
30 °C	CASR [+]	-		χ^2 :2,39; p: 0,1214	(16)
32 °C	CASR [+]	-		χ^2 :3,363; p: 0,067	(11)

Capítulo 2

Eficácia anti-helmíntica *in vitro* de óleos essenciais no controle de *Neoechinorhynchus buttnerae*, um endoparasito de *Colossoma macropomum*

Artigo a ser submetido à revista: Journal of Fish Diseases

Eficácia anti-helmíntica *in vitro* de óleos essenciais no controle de

Neoechinorhynchus buttnerae, um endoparasito de *Colossoma macropomum*

Maria Inês Braga de Oliveira^{1,2} | Franmir Rodrigues Brandão¹ | Maria Juliete Rocha da Silva¹ | Márcio Carvalho Rosa³ | Caio Francisco Santana Farias³ | Daniel Silva dos Santos⁴ | Cláudia Majolo⁵ | Marcelo Róseo de Oliveira⁵ | Francisco Célio Maia Chaves⁵ | Humberto Ribeiro Bizzo⁶ | Marcos Tavares-Dias⁷ | Edsandra Campos Chagas^{1,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

²Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

³Uninorte Laureate International Universities, Manaus, AM, Brasil

⁴Pós-Graduação em Biologia da Interação Hospedeiro-Patógeno, Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia, Manaus, AM, Brasil

⁵Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brazil

⁶Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁷Embrapa Amapá, Macapá, AP, Brazil

Correspondência

Edsandra Campos Chagas, Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brazil. E-mail: edsandra.chagas@embrapa.br

Financiamento

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 02.13.09.003.00.00, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas, 002/2018, 004/2018, 005/2019.

Resumo

Este estudo realizou a caracterização química e avaliou o potencial anti-helmíntico *in vitro* de 11 óleos essenciais (*Aloysia triphylla*, *Adenocalymna alliaceum*, *Allium sativum*, *Croton cajucara* morfotipos branca e vermelha, *Curcuma longa*, *Lippia grata*, *Lippia origanoides*, *Ocimum gratissimum*, *Mentha arvensis* e *Piper aduncum*) no controle de *Neoechinorhynchus buttnerae*, um acantocéfalo de *Colossoma*

macropomum. Os tratamentos dos ensaios *in vitro* consistiram de um controle e nove concentrações de cada óleo essencial, com três repetições cada, avaliados por 24 h. Quanto às concentrações efetivas (CE₅₀), observou-se em 24 h uma redução na concentração dos óleos com o aumento do tempo de exposição, sendo os menores valores de CE₅₀ obtidos para *M. arvensis*, *L. origanoides*, *L. grata*, *C. cajucara* morfotipo vermelha, *O. gratissimum*, *Croton cajucara* branca e *P. aduncum*. Quanto à viabilidade e eficácia *in vitro* no controle de *N. buttnerae*, todos os óleos essenciais apresentaram 100% de eficácia em 24 h. Quanto ao modo de ação, observou-se que *A. triphylla* causou edema nos espaços lacunares com formação de bolhas na subcutícula, inchaço corporal, aumento no volume da cavidade pseudocelomática e degeneração dos órgãos reprodutivos. Portanto, todos os óleos essenciais avaliados apresentam potencial para o controle de *N. buttnerae*. Contudo, estudos *in vivo* precisam ser conduzidos para o estabelecimento de protocolos adequados para o controle e tratamento contra este parasito no cultivo de *C. macropomum*.

PALAVRAS-CHAVE

Acanthocephala, anti-helmínticos, plantas medicinais, tabaqui, tratamento

1 | INTRODUÇÃO

No Brasil, um dos grandes desafios na busca por uma aquicultura sustentável é a manutenção da saúde dos peixes devido as doenças parasitárias. A perda estimada para o setor aquícola, somente devido às doenças chega a 84 milhões de dólares/ano, sem contar a redução do potencial reprodutivo e o impacto negativo na conversão alimentar, diminuindo as taxas de crescimento (Tavares-Dias & Martins, 2017). As doenças parasitárias são um dos principais problemas registrados na criação de peixes nativos como *Colossoma macropomum* (Fujimoto et al., 2019; Valladão et al., 2018). Como alternativas, extratos e óleos essenciais derivados de plantas medicinais vêm sendo avaliados, em função dos resultados demonstrarem que estes produtos são efetivos na redução das taxas de infecção para diferentes espécies de parasitos (Costa et al., 2020; Tavares-Dias, 2018; Valladão et al., 2020).

O interesse pelas plantas medicinais aumentou em todo o mundo devido aos seus custos relativamente baixos e efeitos colaterais limitados nos animais (Van Hai, 2015). Dentre os compostos vegetais estudados, os óleos essenciais e as suas moléculas estão entre as alternativas mais promissoras, visando incrementar as respostas imunes dos peixes, bem como atuar na prevenção e controle de doenças parasitárias (Anastasiou & Buchbauer, 2017; Tavares-Dias, 2018; Doan et al., 2020). A prospecção da atividade anti-helmíntica de óleos essenciais é uma etapa obrigatória inicial para o uso dessas substâncias, assim tem sido investigada principalmente por meio de estudos *in vitro* no controle de ecto e endoparasitos (Doan et al., 2020). Estes ensaios são úteis como forma de triagem da atividade antiparasitária de óleos essenciais contra ovos (Chagas et al., 2018; Minho et al., 2020), larvas (Benelli et al., 2017; Chagas et al., 2018; Corral et al., 2018) e adultos (Costa et al., 2020; Gonzales et al., 2020; Soares et al., 2017) de helmintos pertencentes a diferentes táxons. Porém, são escassas as informações sobre os efeitos de óleos essenciais para controlar e tratar acantocéfalo em peixes (Valladão et al., 2020), incluindo as infecções por *Neochinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, que acometem frequentemente *C. macropomum* na Amazônia brasileira.

No Brasil, *N. buttnerae* é um dos grandes problemas para a criação de *C. macropomum*, pois provoca obstrução intestinal e danos estruturais graves no intestino dos peixes infectados (Aguiar et al., 2018; Matos et al., 2017), mortalidade de alevinos (Malta et al., 2001), bem como redução no crescimento e perda de peso dos peixes na fase de engorda, levando a impactos econômicos negativos (Gomes et

al., 2017; Jerônimo et al., 2017) ainda não estimados. Porém, até o presente momento nenhum tratamento terapêutico para o controle de *N. buttnerae* em *C. macropomum* está disponível, embora estudo recentes busquem por tratamentos alternativos para o tratamento da acantocefalose (Santos et al., 2018; Costa et al., 2020; Seixas et al., 2020). Dada a grande diversidade de plantas medicinais com potencial anti-helmíntico, o objetivo deste estudo foi caracterizar os compostos químicos de 11 óleos essenciais de diferentes espécies vegetais e avaliar seu potencial anti-helmíntico *in vitro* contra *N. buttnerae*.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 | Obtenção dos óleos essenciais

Aloysia triphylla, *Adenocalymna alliaceum*, *Allium sativum*, *Croton cajucara* morfotipos branca e vermelha, *Curcuma longa*, *Lippia grata*, *Lippia origanoides*, *Ocimum gratissimum*, *Mentha arvensis* e *Piper aduncum* foram cultivadas na Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil (10°56'45.7" S e 37°02'58.5" W). Amostras de folhas, inflorescências, rizomas ou bulbos foram utilizados para a extração dos óleos essenciais, pelo processo de hidrodestilação, com uso de aparelho tipo Clevenger durante 3 horas (Chagas et al., 2020).

A composição química dos óleos essenciais foi determinada utilizando cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). As análises foram realizadas num cromatógrafo de gás Agilent 7890A acoplado a um detector de massa 5975C e equipado com uma coluna capilar de 5% de difenil e 95% de dimetilpolissiloxano (DB-5 MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O programa de temperatura era de 60 a 240 °C, a 3 °C/min. As injeções foram realizadas em modo split (1:50) com o injetor a 250 °C. Os componentes do OE foram identificados através de uma pesquisa em informática dos seus espectros de massa com os espectros do Wiley Registry of Mass Spectral Data (6ª edição) e pela comparação entre os índices de retenção linear calculados (Van den Dool & Kratz, 1963) e os dados da literatura (Adams, 2007). Dados quantitativos de áreas de pico foram obtidos utilizando um detector de ionização de chama (FID) operado a 280 °C. As áreas foram normalizadas utilizando um padrão interno (octanoato de metila).

Todos os procedimentos envolvidos na coleta das plantas foram aprovados pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e registrados no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) (Processos nº. A643761 e AB1F0FA).

2.2 | Peixes e aclimação

Cinquenta espécimes de *C. macropomum*, infectados naturalmente por *N. buttnerae* foram adquiridos de uma piscicultura comercial do município de Manaus, estado do Amazonas (Brasil) e transportados para o setor de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM (Brasil). Os peixes foram aclimatados por duas semanas em tanques de polietileno de 1.000 litros, em sistema de aquecimento de água e aeração constante. Durante esse período, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial contendo 32% de proteína bruta até saciedade aparente.

Os parâmetros de qualidade da água registrados durante todo o período experimental foram: oxigênio dissolvido ($5,2 \pm 0,04$ mg/L) e temperatura ($28,1 \pm 0,04$ °C) com emprego de oxímetro digital (YSI Pro20, YSI Inc., USA), pH ($5,8 \pm 0,23$) com uso de pHmetro digital (YSI F-1100, YSI Inc., USA), alcalinidade ($4,95 \pm 0,341$ mg/L) e dureza ($8,63 \pm 0,47$ mg/L) por titulometria e amônia total ($0,694 \pm 0,0297$ mg/L) pelo método de endofenol, de acordo com APHA (1998).

Este estudo foi desenvolvido com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental (protocolo 03/2018).

2.3 | Ensaios *in vitro* com os óleos essenciais no controle de *Neochinorhynchus buttnerae*

Juvenis de tambaqui ($256 \pm 6,14$ g e $18,8 \pm 0,15$ cm) passaram por anestesia profunda (benzocaína, 250 mg/L), seguida de eutanásia por secção medular (CONCEA, 2018) e então cada intestino foi coletado para obtenção dos espécimes adultos de *N. buttnerae*. Os parasitos removidos do intestino de *C. macropomum*, com o auxílio de um estereomicroscópio (Leica, EZ4), foram lavados em solução de cloreto de sódio (0,9%) e mantidos em meio essencial mínimo (MEME) (Sigma-Aldrich®), para confirmação da integridade morfológica e da motilidade.

Os parasitos ($n = 10$) foram transferidos para placas de petri (5,5 cm) contendo 5 mL de meio MEME, em temperatura ambiente ($25 \pm 1,0$ °C), e os tratamentos avaliados foram compostos por um controle (meio MEME+Tween) e nove diferentes concentrações dos 11 óleos essenciais selecionados, com três repetições por tratamento. *A. alliaceum*, *A. sativum*, *A. triphylla*, *C. cajucara* morfotipos branca e vermelha, *C. longa*, *O. gratissimum* e *P. aduncum* (ensaio 1) as concentrações usadas variaram de 0,19 a 50 mg mL⁻¹. Para *L. grata*, *L. origanoides* e

M. arvensis foram utilizadas concentrações menores, variando de 0,4 a 1,4 mg mL⁻¹ (ensaio 2). Todos os óleos essenciais foram solubilizados usando Tween 80 a 3% (Sigma-Aldrich®), antes de ser adicionado o meio MEME.

Os parasitos foram observados, com o auxílio de um estereomicroscópio (Leica, EZ4), a cada 15 m até o período de seis horas de exposição, e novamente observados somente após o período de 24 h para o registro do número de parasitos vivos e mortos, das alterações no comportamento e eventuais deformações. Os parasitos foram considerados mortos na ausência de qualquer motilidade, mesmo após estímulo (Oliveira et al., 2019). Ao final do período de avaliação, determinou-se a viabilidade dos parasitos por 24 h calculando-se a concentração efetiva (CE₅₀) nos intervalos de 2, 6 e 24 horas de exposição de *N. buttnerae* aos 11 óleos essenciais, bem como a eficácia anti-helmíntica dos óleos, usando o método de Zhang et al. (2014): $AE = [B - T] \times 100\% / B$, onde AE é a eficácia antihelmíntica, B é o número médio de *N. buttnerae* mortos no grupo controle e T é o número médio de helmintos mortos no grupo tratado.

2.4 | Análise estrutural de *N. buttnerae* exposto ao óleo essencial de *A. triphylla*

Para avaliar o efeito do óleo essencial sobre os tecidos de *N. buttnerae*, selecionou-se o óleo essencial de *A. triphylla*, visando caracterizar o modo de ação deste. Para isso, amostras dos parasitos do grupo controle e dos expostos aos tratamentos com as diferentes concentrações do óleo essencial foram coletadas após 24 h de exposição. Essas amostras de *N. buttnerae* foram fixadas em formalina tamponada (5%) por 24 h, para posterior processamento histológico conforme metodologia descrita por Culling et al. (1985). As amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol e impregnadas em parafina. As secções de 5 µm foram obtidas e coradas com hematoxilina-eosina/HE (Bancroft & Gamble 2002). As lâminas foram qualitativamente analisadas em microscópio de luz (Leica, modelo DM 500) e fotomicrografias foram obtidas usando uma câmera digital (Sony, DSC-W120).

2.5 | Análises estatísticas

Após 24 horas de exposição aos óleos essenciais, os dados de mortalidade e eficácia sobre os acantocéfalos foram submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade, utilizando o teste de Shapiro-Wilk e Barlett, respectivamente.

Após, os dados foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste post-hoc de Student Newman Keus (SNK) para comparações múltiplas. Esta análise foi realizada usando o Software Bioestat versão 5.0. As concentrações efetivas (CE_{50}) após 2, 6 e 24 horas de exposição e seus respectivos intervalos de confiança (95%) foram calculados pelo método Trimmed Spearman-Karber (Hamilton et al 1977). A diferença entre as CE_{50} foi considerada significativa quando houve sobreposição dos intervalos de confiança (Roditakis et al., 2005).

3 | RESULTADOS

3.1 | Composição química dos óleos essenciais

Os principais compostos encontrados nos óleos essenciais são apresentados na Tabela 1. Os principais constituintes encontrados nos óleos essenciais foram o dilapiol (80,7%) em *P. aduncum*, mentol (86,1%) em *M. arvensis*, carvacrol (42,2%) em *L. grata*, 1,8-cineol (39,5%) em *O. gratissimum* e p-cimeno (37,8%) em *L. origanoides*. *Adenocalymna alliaceum* e *Allium sativum* resultaram em óleos ricos em compostos sulfurados, particularmente trissulfureto de dialil (34,3% e 58,9%, respectivamente) e dissulfureto de dialil (34,3% e 25,3%, respectivamente). Os óleos dos dois morfotipos de *C. cajucara* apresentaram compostos diferentes, pois sacaca branca foi rico em linalol (23,0%), enquanto sacaca vermelha teve germacrenoa D como constituinte principal (11,5%). O óleo de *Aloysia triphylla* foi rico em β -pineno (22,1%) e os principais constituintes do óleo *C. longa* foram α -phellandreno (20,2%) e α -tumerona (19,6%).

3.2 | Viabilidade de *Neochinorhynchus buttnerae* após 24 horas de exposição aos óleos essenciais

A Tabela 2 mostra os valores médios de mortalidade *in vitro* de *N. buttnerae* após exposição às diferentes concentrações dos 11 óleos essenciais. Após 24 h de exposição aos óleos essenciais todos os *N. buttnerae* mantiveram a motilidade e a integridade morfológica no grupo controle usando meio MEME+Tween. Nesse primeiro ensaio, com os óleos de *O. gratissimum*, *C. cajucara*, *P. aduncum*, *A. triphylla*, *A. alliaceum* e *A. sativum*, na menor concentração ($0,19 \text{ mg mL}^{-1}$), observou-se uma sobrevivência de todos os acantocéfalos, com exceção do óleo de

C. longa que nesta mesma concentração apresentou mortalidade de $1,67 \pm 3,3$, mas que não diferiu significativamente ($p > 0,05$) do grupo controle.

A partir da concentração de $0,78 \text{ mg mL}^{-1}$ do óleo de *A. triphylla* se alcançou a mortalidade de todos os parasitos. Com os óleos essenciais de *A. sativum*, *C. cajucara*, *C. longa*, *O. gratissimum*, *P. aduncum*, a mortalidade de todos os acantocéfalos ocorreu nas concentrações entre $1,56$ e $3,12 \text{ mg mL}^{-1}$. Com o óleo essencial de *A. alliaceum*, somente nas maiores concentrações testadas (25 e 50 mg mL^{-1}), o máximo de mortalidade de *N. buttnerae* foi alcançada (Tabela 2).

No segundo ensaio, os óleos essenciais de *L. grata*, *L. origanoides* e *M. arvensis* não causaram nenhuma mortalidade dos parasitos na menor concentração utilizada, não diferindo do grupo controle após 24 h de exposição. Na concentração de $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ de *M. arvensis* houve a mortalidade de todos os acantocéfalos em 24 h de exposição, e para *Lippia origanoides* a mortalidade de todos os acantocéfalos ocorreu a partir da concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (Tabela 2).

3.3 | Concentrações efetivas (CE₅₀) dos óleos essenciais para *N. buttnerae* em diferentes tempos de exposição

Para os óleos essenciais de *C. cajucara* morfotipos branca e vermelha, *L. grata*, *L. origanoides* e *O. gratissimum*, os valores de CE₅₀(2h), CE₅₀(6h) e CE₅₀(24h) estimadas foram significativamente menores ($p < 0,05$) quanto maior o tempo de exposição, conforme indicado pela não sobreposição dos intervalos de confiança. Para o óleo de *P. aduncum*, o menor valor de CE₅₀ foi registrado após 2 h de exposição ($0,73 \text{ mg mL}^{-1}$) e não houve diferença ($p > 0,05$) entre os valores estimados para CE₅₀(6h) e CE₅₀(24h). Para *A. tryphylla* a proporção de mortalidade monotonicamente crescente em relação às concentrações só foi observada após 2 e 6 h de exposição, permitindo a determinação da CE₅₀ somente nestes tempos e com alta qualidade do ajuste dos dados à relação não linear, sendo o menor valor de CE₅₀ registrado em 6 h de exposição. Para os óleos de *A. aliaceum* e *A. sativum*, em razão da proporção de mortalidade não monotonicamente crescente em relação às concentrações avaliadas, a estimativa da CE₅₀ foi comprometida. Para o óleo essencial de *C. longa*, um valor elevado foi estimado para a CE₅₀ após 2 h de exposição e com grande amplitude do intervalo de confiança. Para o óleo de *M. arvensis* a proporção de mortalidade monotonicamente crescente em relação às concentrações só foi observada após 24 h de exposição, permitindo a determinação

da CE₅₀ somente neste tempo, mas com baixa qualidade do ajuste dos dados à relação não linear (Tabela 3).

3.4 | Eficácia anti-helmíntica *in vitro* no controle de *Neoechynorhynchus buttnerae*

Quanto a eficácia anti-helmíntica *in vitro* observada para todos os óleos essenciais, em duas horas de exposição, somente os óleos de *C. cajucara* morfotipos branca e vermelha e *O. gratissimum* tiveram 100% de eficácia no controle de *N. buttnerae* a partir da concentração de 6,25 mg mL⁻¹ (Figura 1). Para *A. triphylla*, esta mesma eficácia foi alcançada a partir da concentração de 3,12 mg mL⁻¹, e para os demais óleos essenciais a eficácia variou de 10 a 90%. Após 6 h de exposição, todos os óleos essenciais alcançaram 100% de eficácia no controle de *N. buttnerae*, com exceção do óleo de *A. sativum*. Após 24 h de exposição, todos os óleos essenciais apresentaram 100% de eficácia *in vitro* no controle de *N. buttnerae*. Comparando os três tempos de exposição, um percentual significativamente maior de eficácia antiparasitária foi observado entre 2 h e 24 h de exposição de *N. buttnerae* aos óleos essenciais de *C. longa* (p: 0,012), *A. sativum* (p: 0,044), *L. origanoides* (p: 0,023) e *M. arvensis* (p: 0,049) (Figura 2).

De forma geral, entre os óleos que apresentaram os melhores resultados de eficácia destacamos *A. sativum*, *C. cajucara* morfotipo branca e *P. aduncum* em concentrações a partir de 3,125 mg mL⁻¹, *C. cajucara* morfotipo vermelha, *C. longa* e *O. gratissimum* a partir de 1,56 mg mL⁻¹, *L. grata* e *L. origanoides* a partir de 0,9 mg mL⁻¹, *A. triphylla* a partir de 0,78 mg mL⁻¹ e *M. arvensis* a partir de 0,7 mg mL⁻¹ (Figura 1).

3.5 | Alterações histológicas em *N. buttnerae* após exposição ao óleo essencial de *A. triphylla*

As análises histológicas de *N. buttnerae* vivos, pertencentes ao grupo controle, revelaram um tegumento espesso, formado por uma cutícula externa bem marcada pela coloração, comumente invaginada formando criptas. Sob a cutícula, há uma subcutícula de tecido sincicial com três zonas: a zona estriada, fracamente corada, a zona fibrosa, com fibras bem coradas e a zona fibrosa radial, onde se evidenciam porções dos canais lacunares da parede corporal. Abaixo da subcutícula foram evidenciadas as camadas musculares interna e externa (Figura 3A), que

delimitam a cavidade pseudocelomática, onde foram visualizadas porções dos órgãos reprodutivos (Figura 3B). Essa estrutura tegumentar também foi observada nos acantocéfalos expostos a concentrações de $0,39 \text{ mg mL}^{-1}$ do óleo essencial de *A. triphylla*, que se mantiveram viáveis após 24 horas de exposição (Figura 3C). Após a mortalidade de *N. buttnerae* expostos a $0,78 \text{ mg mL}^{-1}$ do óleo essencial, a dissociação entre a subcutícula e a camada muscular subjacente foi observada (Figura 3D). Além desta alteração, edema nos espaços lacunares com formação de bolhas na subcutícula foram observados nos parasitos expostos a 50 mg mL^{-1} do óleo essencial (Figura 3E). Em parasitos expostos a concentrações maiores que $0,39 \text{ mg mL}^{-1}$ ocorreu inchaço corporal, houve aumento no volume da cavidade pseudocelomática e degeneração dos órgãos reprodutivos (Figura 3F).

4 | DISCUSSÃO

Dentre os produtos naturais de origem vegetal, os terpenos não são apenas o maior grupo de compostos químicos, mas também os que contêm a maior diversidade estruturais (Degenhardt et al., 2009). Isso pode ser evidenciado na variedade de substâncias identificadas nos óleos essenciais das plantas avaliadas no presente estudo. Foi grande a variação na composição química dos óleos essenciais das diferentes espécies de plantas medicinais, inclusive entre as espécies da uma mesma família, confirmando a natureza química altamente variável dos metabólitos secundários dos óleos essenciais dessas plantas. Essa mesma diversidade foi relatada por Joshi et al. (2020) para extratos de plantas e, segundo os autores, a principal limitação foi que estas misturas complexas de fitoconstituintes podem agir de forma individual ou sinérgica, ou às vezes de maneira antagônica, resultando em bioatividades variadas. Entretanto, neste estudo foi observada a elevada mortalidade *in vitro* de *N. buttnerae* com todos os óleos essenciais avaliados, principalmente nas maiores concentrações testadas, revelando o potencial destes óleos e de seus diversos compostos químicos no controle do acantocéfalo *N. buttnerae*, que hoje representa um dos maiores problemas sanitários para o cultivo de *C. macropomum*.

A variabilidade da resposta biológica de cada organismo em função da suscetibilidade à exposição de uma determinada substância é um fator importante nos ensaios de toxicidade. Na exposição *in vitro* de *N. buttnerae* ao óleo essencial de *A. triphylla* a mortalidade foi observada após duas horas e seis horas de exposição; no entanto após 24 h de exposição, o alcance de 100% de mortalidade nas concentrações

intermediárias comprometeu a estimativa da CE_{50} . Já nos ensaios com *M. arvensis*, a mortalidade necessária para estimativa da CE_{50} só foi alcançada após 24 h de exposição dos acantocéfalos ao óleo essencial. Portanto, o tempo com que os parasitos permaneceram em contato com o óleo essencial foi importante na determinação do seu efeito tóxico. Esse fato deixa claro a importância de se considerar como tempo final de avaliação 24 h, no intuito de padronizar os protocolos, conforme recomendado por Oliveira et al. (2019), mas também avaliar os efeitos em diferentes tempos de exposição visando detectar especificidades nas respostas de cada grupo de parasitos.

As concentrações efetivas que promoveram a mortalidade de 50% de *N. buttnerae* em 6 e 24 horas foram alcançadas com os óleos essenciais de *C. cajucara* morfotipos branca e vermelha, *L. grata*, *L. origanoides*, *O. gratissimum*, e *P. aduncum*; estes resultados evidenciam que o mesmo padrão de toxicidade ocorreu nos mesmos óleos essenciais em ambos tempos de exposição usados, exceto para *A. triphylla* e *M. arvensis*. Além disso, houve uma redução das concentrações efetivas com o aumento do tempo de exposição, o que é extremamente desejável considerando o protocolo de tratamento do acantocéfalo *N. buttnerae* em *C. macropomum*, pela necessidade de uma menor quantidade de óleo essencial que implica em menor custo e pelo menor risco de toxicidade para os peixes. Esse mesmo padrão de redução da CE_{50} em função do tempo de exposição foi também relatado por Santos et al. (2018), usando o óleo essencial de *Piper hispidinervum*, *Piper hispidum*, *Piper marginatum* e *Piper callosum* no controle *in vitro* de *N. buttnerae*.

Na determinação da atividade anti-helmíntica *in vitro* dos óleos essenciais observou-se que todos os 11 óleos essenciais das sete diferentes famílias botânicas (Tabela 1) foram eficazes contra *N. buttnerae*. Similarmente, os óleos essenciais de *Mentha piperit*), *Lippia alba* e *Zingiber officinale* também mostraram eficácia *in vitro* contra *N. buttnerae* (Costa et al., 2020). *Piper hispidinervum*, *P. hispidum*, *P. marginatum* e *P. callosum* também tiveram eficácia *in vitro* contra *N. buttnerae*, mas os melhores resultados foram alcançados com o óleo essencial de *P. hispidinervum* (Santos et al., 2018). A avaliação da inviabilização, eclosão e integridade da membrana dos ovos de *N. buttnerae*, em ensaios *in vitro*, com os óleos essenciais de *L. alba*, *L. grata* e *L. sidoides* (0,5; 1; 2; 5 e 10 mg mL⁻¹) foram estudadas e mostraram que *L. alba* apresentou baixa eficácia (<35%) no controle de ovos de *N.*

buttnerae. *Lippia grata* apresentou 100% de eficácia na maior concentração, enquanto *L. sidoides* teve 100% de eficácia em um efeito dose dependente, evidenciando o potencial anti-helmítico desses óleos de *Lippia* spp. em outros estágios do ciclo de vida de *N. buttnerae*, como na fase de ovos (Serra, 2019). Para os morfotipos de *C. cajucara* (branca e vermelha) não há relatos de seu uso no controle de acantocéfalos de peixes até agora. Porém, foi relatada uma baixa atividade *in vitro* na eclosão de ovos e desenvolvimento larval de nematoides de ovelhas (Chagas et al., 2018). Seixas et al. (2020) avaliando os efeitos anti-helmíticos das oleoresinas de *Copaifera duckei*, *Copaifera pubiflora*, *Copaifera reticulata*, *Copaifera paupera* e *Copaifera multijuga* no controle de *N. buttnerae*, encontraram que em altas concentrações ($0,1868 \text{ mg mL}^{-1}$), todas as espécies de *Copaifera* resultaram em 100% de mortalidade de *N. buttnerae* após 24 h, exceto com *C. multijuga*. Além disso, essas oleoresinas foram moderadamente tóxicas para *C. macropomum*.

Considerando a natureza química diversificada dos óleos essenciais, a atividade anti-helmítica deve compreender mais de um mecanismo específico e provavelmente envolve diferentes processos moleculares, celulares ou teciduais. Estudos sobre danos morfológicos de nematoides em helmintos expostos aos óleos essenciais relataram alterações estruturais como perda da arquitetura tegumentar normal, formação de bolhas e perda dos espinhos (Matos Rocha et al., 2016). Além disso, tem sido descrito inchaço do sincício tegumentar, vacuolização e ruptura do tegumento em trematoides (Massoud et al., 2012) e alterações no tegumento da região do soma, perda de ganchos e microtrichos da região escólex e a presença de numerosas bolhas em cestoides (Maggiore et al., 2012). Nossos resultados sugerem que a perda da viabilidade de *N. buttnerae* após o tratamento com o óleo essencial de *A. triphylla* causou danos cutâneos nos parasitos, pois o tegumento ou epiderme compõe a maior parte da parede corporal dos acantocéfalos (Taraschewski, 2000). Como a absorção dos nutrientes ocorre exclusivamente pelo tegumento, danos aos órgãos podem comprometer a nutrição e sobrevivência de acantocéfalos. O inchaço corporal comumente observado nos acantocéfalos mortos ou moribundos após exposição ao óleo essencial de *A. triphylla*, e a expansão da cavidade pseudocelomática pode estar relacionada com possíveis prejuízos osmorregulatórios. Devido às características lipofílicas das moléculas, o modo de ação dos terpenos em combater os agentes invasores é causando lesões e desequilíbrio osmótico nas células

dos patógenos (Gershenzon & Dudareva, 2007). Resultados semelhantes foram relatados por Seixas et al. (2020) em *N. buttnerae* expostos às oleoresinas de *C. duckei*, *C. pubiflora*, *C. reticulata* e *C. paupera*, que causaram inchaço e edema corporal generalizado, além de vacuolizações difusas na camada externa. Portanto, os resultados histopatológicos confirmam que os constituintes do óleo essencial de *A. triphylla* podem causar ruptura da membrana e formação de vacúolos em *N. buttnerae*.

Em conclusão, os 11 óleos essenciais de sete diferentes famílias botânicas apresentaram eficácia *in vitro* contra a viabilidade do *N. buttnerae*. Assim, para futuros estudos *in vivo* sugere-se o uso dos óleos essenciais, bem como os compostos isolados de *A. triphylla*, *C. cajucara* morfotipos branca e vermelha, *L. grata*, *L. origanoides*, *O. gratissimum*, *M. arvensis* e *P. aduncum*. Portanto, dada a gravidade desta parasitose na criação de *C. macropomum*, são necessários estudos de toxicidade com os compostos isolados dos óleos essenciais avaliados neste estudo bem como a realização de ensaios *in vivo* com estes óleos essenciais ou seus compostos isolados para o estabelecimento de protocolos adequados de tratamento visando o controle de da infecção por *N. buttnerae*.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (MP2 01.02.09.003.00.00) e a Fundação de Amparo à Pesquisa da Amazônia - FAPEAM (Universal Amazonas 002/2018 e Amazonas Estratégico 004/2018) pelo apoio financeiro. Aos assistentes Iraní Moraes, Edson Paiva Afonso e José Marconde da Costa e Silva, da Embrapa Amazônia Ocidental, pela assistência técnica durante os experimentos. À FAPEAM pelo apoio financeiro para a tradução do manuscrito (PAPAC 005/2019, Processo 062.00847.2019).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

APROVAÇÃO ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa Amazônia Ocidental (Protocolo 03/2018 - CEUA / CPAA).

ORCID

Edsandra Campos Chagas <https://orcid.org/0000-0001-9170-9725>

Humberto Ribeiro Bizzo <https://orcid.org/0000-0001-5370-6478>

REFERÊNCIAS

- Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th ed. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL.
- Aguiar, L. S., Oliveira, M. I. B., Matos, L. V., Gomes, A. L. S., Costa, J. I., Silva, G. S. (2018). Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Parasitology Research, 117, 1689-1698. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5840-8>
- Anastasiou, C., Buchbauer, G. (2017). Essential oils as immunomodulators: some examples. Open Chemistry, 15, 352-370. <https://doi.org/10.1515/chem-2017-0037>
- APHA - American Public Health Association. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 th ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation. 937p
- Bancroft, J. D., Gamble, M. (2002). Theory and practice of histological techniques. 5th Ed. Edinburgh. Churchill Livingstone Pub. 172, 593–620.
- Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Cianfaglione, K., Ciaschetti, G., Conti, F., Nicoletti, M. Senthil-Nathan, S., Mehlhorn, H., Maggi, F. (2017). Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and antagonistic effects. Parasitology International, 66, 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.01.012>
- Chagas, A. C. S., Figueiredo, A., Politi, F. A. S., Moro, I. J., Esteves, S. N., Bizzo, H. R., Gama, P. E., Chaves, F. C. M. (2018). Efficacy of essential oils from plants cultivated in the Amazonian Biome against gastrointestinal nematodes in sheep. Journal of Parasitic Diseases, 42, 357-364. <https://doi.org/10.1007/s12639-018-1007-x>

- Chagas, E. C., Majolo, C., Monteiro, P. C., de Oliveira, M. R., Gama, P. E., Bizzo, H. R., Chaves, F. C. M. (2020). Composition of essential oils of *Mentha* species and their antimicrobial activity against *Aeromonas* spp. *Journal of Essential Oil Research*, 32, 1-7. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1741457>
- CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, 2018. Diretriz Da Prática Eutanásia Em Animais Incluídos Em Atividades Ensino Ou Pesquisa Científica. https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf (accessed março 20 2020).
- Corral, A. C. T., Queiroz, M. N., Andrade-Porto, S. M., Morey, A. A. M., Chaves, F. C. M., Fernandes, V. L. A., Ono, E. A., Affonso, E. G. (2018). Control of *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) in juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) by the oral application of essential oil of *Piper aduncum*. *Aquaculture*, 494, 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.062>
- Costa, C. M. S., Cruz, M. G., Lima, T. B. C., Ferreira, L. C., Ventura, A. S., Brandão, F. R., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Martins, M. L., Jerônimo, G. T. (2020). Efficacy of the essential oils of *Mentha piperita*, *Lippia alba* and *Zingiber officinale* to control the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Collossoma macropomum*. *Aquaculture Reports*, 18, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100414>
- Culling, C. F. A., Allison, R. T., Barr, W. T. (1985) Cellular pathology technique, 4th edn. Butterworths, London, p 642.
- Degenhardt, J., Köllner, T. G., Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70, 1621-1637. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030>
- Doan, H. V., Soltani, E., Ingelbrecht, J., Soltani, M. (2020). Medicinal Herbs and Plants: Potential Treatment of Monogenean Infections in Fish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28, 2, 260-282. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1712325>
- Fujimoto, R. Y., Hide, D. M. V., Paixao, P., Abe, H. A., Dias, J. A. R., Sousa, N. C., Couto, M., Silva, R., Madi, R. R., Benavides, M. V., Ishikawa, M. M., Chagas,

- E. C., Boijink, C., Dompieri, M. H. G., Pereira, A., Maciel, P. O. (2019). Fauna parasitária e relação parasito-hospedeiro de tambaquis criados na região do Baixo São Francisco, nordeste do Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71, 563-570. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10306>
- Gershenzon, J., Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3, 408-414. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>
- Golvan, Y. J. (1956) Acanthocephales d'amazone. Redescription d'*Oligacanthorhynchus iheringi* Travassos, 1916 et description de *Neoechinorhynchus buttnerae* n. sp. (Neacanthocephala – Neoechinorhynchidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 31, 500–524.
- Gomes, A. L. S., Coelho-Filho, J. G., Silva, W. V., Oliveira, M. I. B., Bernardino, G., Costa, J. I. (2017). The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) outbreaks on productive and economic performance of the tambaqui *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818), reared in ponds. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45, 496-500. <http://dx.doi.org/10.3856/vol45-issue2-fulltext-25>
- Gonzalez, A. P. F., Yoshioka, E. T. O., Mathews, P., Mertins, O., Chaves, F. C. M., Videira, M. N., Tavares-Dias, M. (2020). Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Collossoma macropomum* (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. *Aquaculture*, 528, 735500. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735500>
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science e Technology*, 11, 714-719. <https://doi.org/10.1021/es60130a004>
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. Aromatic natural raw materials – Vocabulary: ISO 9235. Geneva, 2013. 8p.
- Jerônimo, G. T., Pádua, S. B., Belo, M. A. A., Chagas, E. C., Taboga, S. R., Maciel, P. O., Martins, M. L., (2017). *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala)

- infection in farmed *Colossoma macropomum*: A pathological approach. *Aquaculture*, 469, 124-127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.027>
- Joshi, P., Yadaw, G. S., Joshi, S., Semwal, R. B., Semwal, D. K. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal herbs and their polyherbal formulation. *South African Journal of Botany*, 130, 440–447. doi:10.1016/j.sajb.2020.01.031
- Maggiore, M. A., Albanese, A. A., Gende, L. B., Eguaras, M. J., Denegri, G. M., Elissondo, M. C. (2012). Anthelmintic effect of *Mentha* spp. essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. *Parasitology Research*, 110, 1103-1112. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2595-x>
- Malta, J. C. O., Gomes, A. L. S., Andrade, S. M. S., Varella, A. M. B. (2001) Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. *Acta Amazônica*, 31, 133–143. <https://doi.org/10.1590/1809-43922001311143>
- Massoud, A. M., Shalaby, H. A., El Khateeb, R. M., Mahmoud, M. S., Kutkat, M. A. (2012) Effects of Mirazid® and myrrh volatile oil on adult *Fasciola gigantica* under laboratory conditions. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 875-884. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\) 60246-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12) 60246-9)
- Matos, L. V., Oliveira, M. I. B., Gomes, A. L. S., Silva, G. S. (2017). Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. *Parasitology research*, 116, 1029–1037. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5384-3>
- Matos-Rocha, T. J., Cavalcanti, M. G. S., Veras, D. L., Feitosa, A. P. S., Gonçalves, G. G. A., Portela-Junior, N. C., Lúcio, A. S. S. C., Silva, A. L., Padilha, R. J. R., Marques, M. O. M., Barbosa-Filho, J. M., Alves, L. C., Brayner, F. A. (2016). Ultrastructural changes in *Schistosoma mansoni* male worms after in vitro incubation with the essential oil of *Mentha x villosa* Huds. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 58, 1-6. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658004>
- Minho, A. P., Domingues, L. F., Gainza, Y. A., Figueiredo, A., Boligon, A. A., Domingues, R., Chagas, A. C. (2020). *In vitro* screening of plant extract on

- Haemonchus contortus* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Journal of Essential Oil Research, 32, 269-278. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1746414>
- Oliveira, L. C., Majolo, C., Brandão, F. R., Farias, C. F. S., Oliveira, M. I. B., Santos, W. B., Monteiro, P. C., Rocha, M. J. S., Chagas, E. C., Tavares-Dias, M. (2019) Avermectins, praziquantel and levamisole have in vitro efficacy against *Neoechinorhynchus buttnerae* (Neoechinorhynchidae) in *Colossoma macropomum*: A Serrasalminidae from the Amazon. Journal of Fish Diseases, 42, 765-772. <https://doi.org/10.1111/jfd.12980>
- Roditakis, E., Roditakis, N. E., Tsagkarakou, A. (2005). Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. Pest Management Science, 61, 577-582. <https://doi.org/10.1002/ps.1029>
- Santos, W. B., Majolo, C., Santos, D. S., Rosa, M. C., Monteiro, P. C., Rocha, M. J. S., Oliveira, M. I. B., Chaves, F. C. M., Chagas, E. C. (2018). In vitro efficacy of essential oils of Piperaceae species in the control of acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae*. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, 12, 460-469.
- Seixas, A. T., Gallani, S. U., Noronha, L. S., Silva, J. J. M., Paschoal, J. A. R., Bastos, J. K., Valladão, G. M. R. (2020). *Copaifera oleoresins* as a novel natural product against acanthocephalan in aquaculture: Insights in the mode of action and toxicity. Aquaculture Research, 1–8. <https://doi.org/10.1111/are.14813>
- Serra, B. N. V. (2019). Óleos essenciais de *Lippia* spp. no controle do estágio inicial do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*, endohelminto de tambaqui *Colossoma macropomum*. Dissertação de mestrado. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
- Soares, B. V., Cardoso, A. C. F., Campos, R. R., Goncalves, B. B., Santos, G. G., Chaves, F. C. M., Chagas, E. C., Tavares-Dias, M. (2017). Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia organoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. Aquaculture, 469, 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001>
- Taraschewski H. (2000). Host-parasite interactions in Acanthocephala: a morphological approach. Advances in Parasitology, 46, 1–179. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(00\)46008-2](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(00)46008-2)

- Tavares-dias, M. (2018). Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquatic Living Resources*, 31, 1-13. <https://doi.org/10.1051/alr/2018001>
- 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, 913–918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Jerônimo, G. T., Seixas, A. T. (2020). Challenges in the control of acanthocephalosis in aquaculture: special emphasis on *Neoechinorhynchus buttnerae*. *Reviews in Aquaculture*, 12, 1360-1372. <https://doi.org/10.1111/raq.12386>
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Pilarski, F. (2018). South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10, 351-369. <https://doi.org/10.1111/raq.12164>
- Van den Dool, H., Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11, 463-471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
- Van Hai, N. (2015). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture*, 446, 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.014>
- Zhang, X. P., Li, W. X., Ai, T. S., Zou, H., Wu, S. G., Wang, G. T. (2014). The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Aquaculture*, 420, 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.022>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

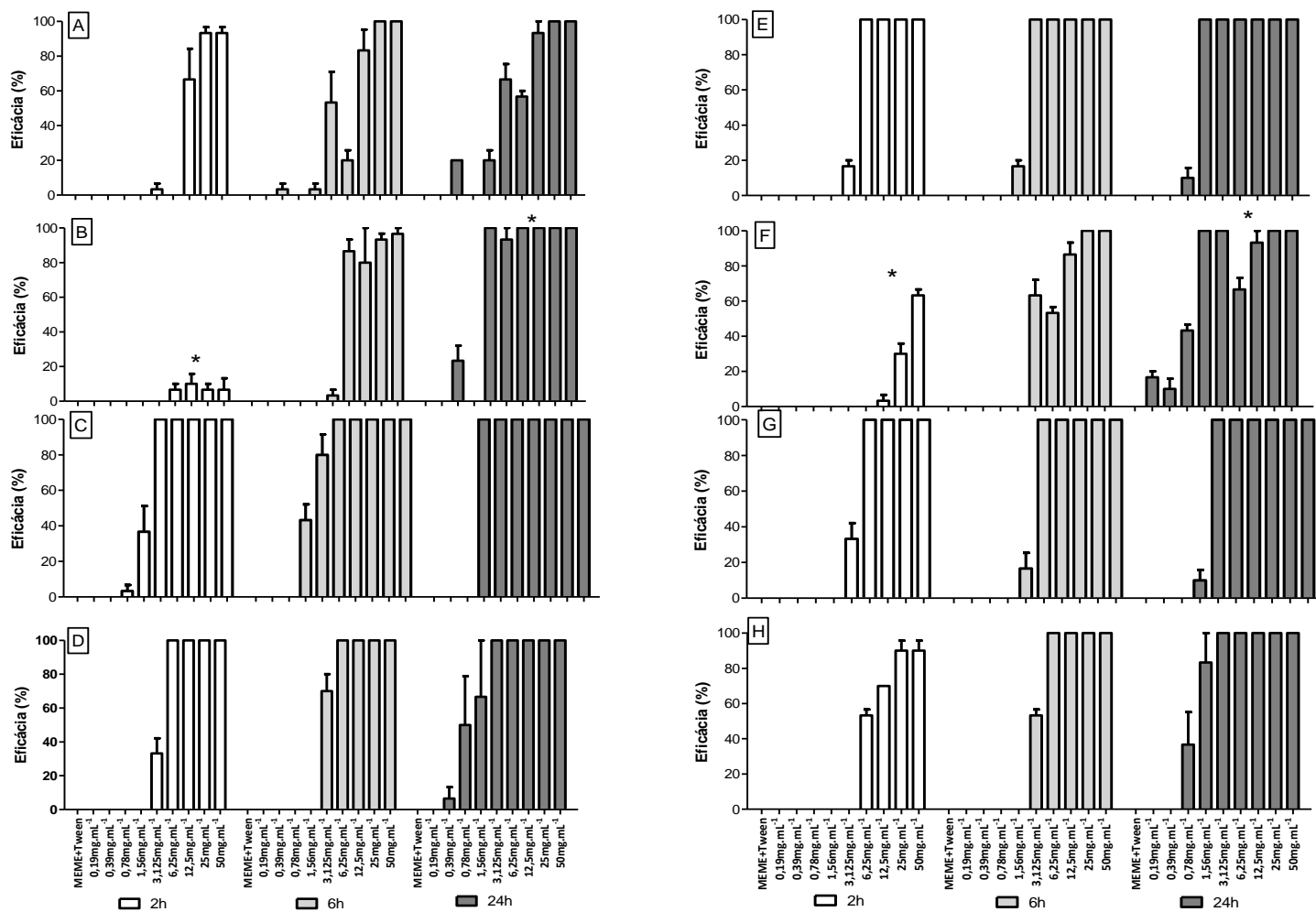


FIGURA 1. Eficácia anti-helmíntica in vitro de óleos essenciais contra *Neochinorhynchus buttnerae* em diferentes tempos de exposição (A – *Adenocalymna alliaceum*, B – *Allium sativum*, C – *Aloysia triphylla*, D – *Croton cajucara* morfolito branca, E – *Croton cajucara* morfolito vermelha, F – *Curcuma longa*, G – *Ocimum gratissimum*, H – *Piper aduncum*). Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na eficácia entre os tempos do tratamento.

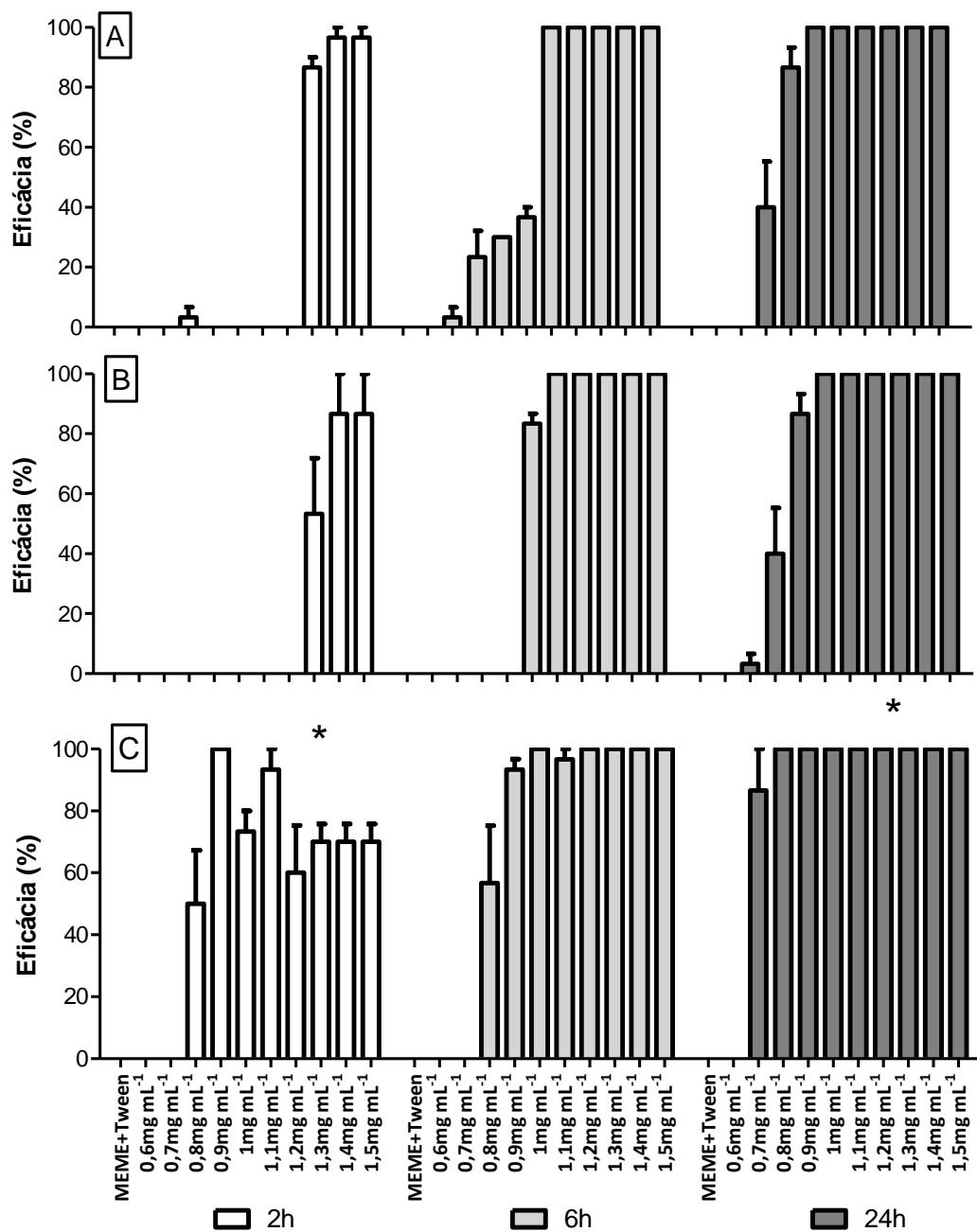


FIGURA 2. Eficácia anti-helmíntica in vitro de óleos essenciais contra *Neochinorhynchus buttnerae* em diferentes tempos de exposição (a – *Lippia grata*, b – *Lippia origanoides*, c – *Mentha arvensis*). * indica diferença significativa ($p < 0,05$) na eficácia entre os tempos do tratamento.

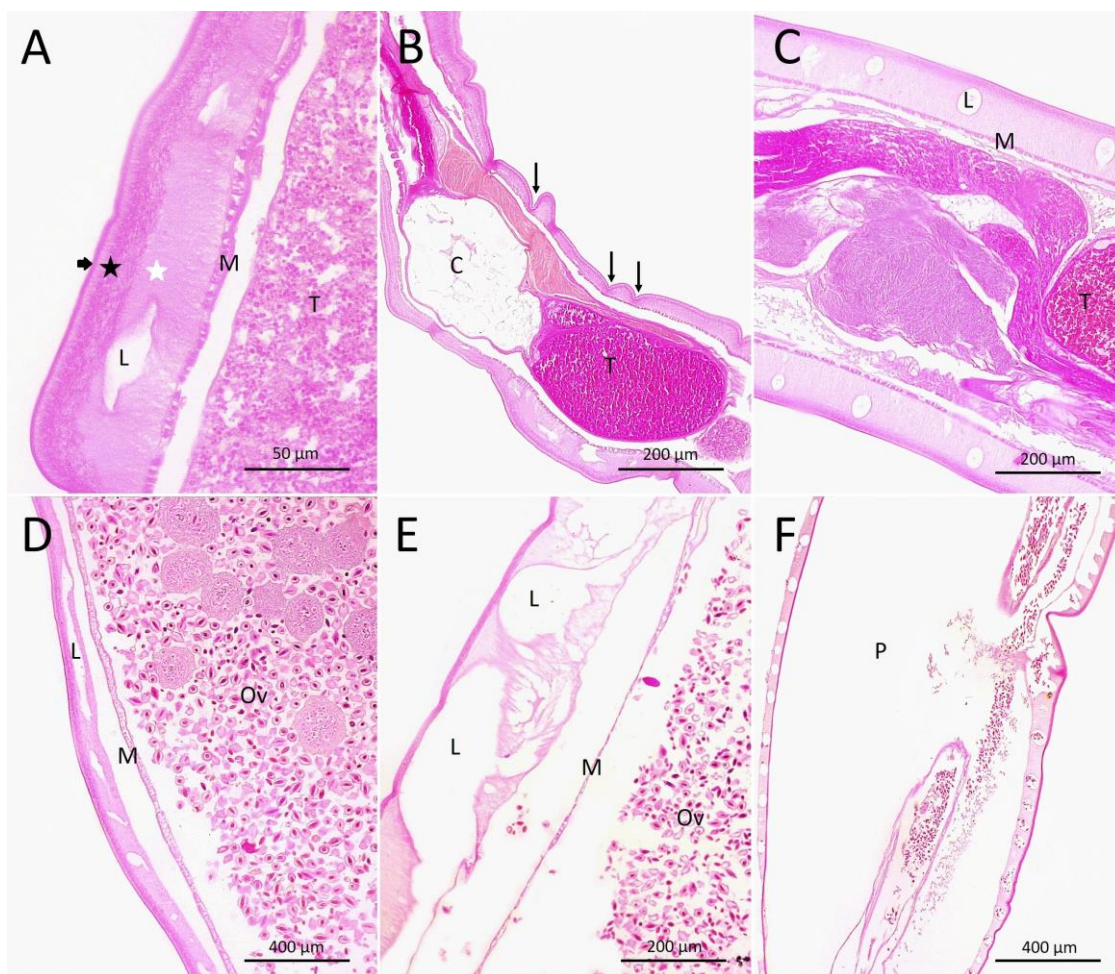


FIGURA 3. Efeito do óleo essencial de *Aloysia triphylla* na morfologia de *Neoechinorhynchus buttnerae*. (A) estrutura do tegumento em espécime não tratado com óleo essencial (grupo controle): cutícula (seta curta) na superfície externa do tegumento e sob esta, a zona estriada, delgada e clara; subjacente a esta está a zona fibrosa em feltro, mais espessa e intensamente corada (estrela preta) e zona fibrosa radial (estrela branca); L: lacuna no tecido sincicial da subcutícula; M: camada muscular; P: pseudoceloma; T: testículo; (B) criptas no tegumento em espécime não tratado com óleo essencial (grupo controle); (C) tegumento íntegro de *N. buttnerae* vivo após 24 h de exposição ao óleo essencial de *A. triphylla* ($0,39 \text{ mg mL}^{-1}$); (D) *N. buttnerae* após tratamento com $0,78 \text{ mg mL}^{-1}$ de óleo essencial; (E) edema dos espaços lacunares com formação de bolhas e dissociação entre a camada muscular e a subcutícula, em espécimes tratados com 50 mg mL^{-1} do óleo essencial; (F) expansão do espaço pseudocelomático associado ao inchaço corporal em espécime tratado com $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ do óleo de *A. triphylla*.

Tabela 1. Dados taxonômicos e principais constituintes dos óleos essenciais das plantas medicinais utilizadas nos ensaios *in vitro*.

Nome botânico	Família botânica	Nomes comuns	Partes usadas	Compostos químicos mais abundantes
<i>Adenocalymna alliaceum</i>	Bignoniaceae	Cipó alho	Folhas	Bis-alil-dissulfeto (34,3%); Bis-alil-trissulfeto (34,3%); Bis-alil-tetrassulfeto (10,3%)
<i>Allium sativum</i>	Liliaceae	Alho	Bulbo	Trissulfeto de dialila (58,9%); Dissulfeto de dialila (25,3%); Trissulfeto de metila e alila (8,1%)
<i>Aloysia triphyla</i>	Verbenaceae	Cidrão/ Limonete	Folhas/ inflorescências	β -pineno (22,1%); monoTrans-pinocanfona (13,1%); Acetato de trans-pinocarvila (7,6%); Guaiol (5,3%)
<i>Croton cajucara</i> (morfortipo branca)	Euphorbiaceae	Sacaca branca	Folhas	Linalol (23,015%); Trans-cariofileno (13,7%); Germacreno D (8,045%)
<i>Croton cajucara</i> (morfortipo vermelha)	Euphorbiaceae	Sacaca vermelha	Folhas	Germacreno D (11,8%); Germacreno A (6,1%); B-elemeno (6,0%)
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Açafrão da Índia	Rizomas	α -felandreno (20,2%); α -tumerona (19,6%); ar-tumerona (10,4%)
<i>Ocimum gratissimum</i>	Lamiaceae	Alfavaca	Folhas/ inflorescências	1,8-cineol (39,5%); Eugenol (14,7%); B-selineno (12,6%)
<i>Lippia grata</i>	Verbenaceae	Alecrim de tabuleiro	Folhas/ inflorescências	Carvacrol (42,2%); <i>p</i> -cimeno (11,2%); γ -terpineno (10,7%); timol, metil-éter (6,1%)
<i>Lippia origanoides</i>	Verbenaceae	Sálvia-de-Marajó	Folhas/ inflorescências	<i>p</i> -cimeno (37,8%); carvacrol (14%); γ -terpineno (11,6%); linalol (6,1%)
<i>Mentha arvensis</i>	Lamiaceae	Hortela-japonesa	Folhas/ inflorescências	Mentol (86,1%); mentona (4,3%); iso-mentona (3,7%)
<i>Piper aduncum</i>	Piperaceae	Pimenta-de-macaco	Folhas/ inflorescências	Dilapiol (80,7%); (<i>E</i>)-cariofileno (4,6%); miristicina (2,9%)

TABELA 2. Efeito *in vitro* dos óleos essenciais na mortalidade (média ± erro padrão) de *Neoechinorhynchus buttnerae* após 24 h de exposição.

Plantas	MEME +Tween	0,19 mg mL ⁻¹	0,39 mg mL ⁻¹	0,78 mg mL ⁻¹	1,56 mg mL ⁻¹	3,125 mg mL ⁻¹	6,25 mg mL ⁻¹	12,5 mg mL ⁻¹	25 mg mL ⁻¹	50 mg mL ⁻¹
1^o ensaio										
AA	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	2,0±0,0 ^{ac}	0,0±0,0 ^{ac}	2,0±0,58 ^{ac}	6,67±0,88 ^{bc}	5,67±0,33 ^{ac}	9,33±1,33 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}
AS	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	2,33±0,88 ^{ac}	0,0±0,0 ^a	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}
AT	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b
CCB	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,67±0,67 ^a	5,0±2,88 ^a	6,67±3,33 ^{ab}	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b
CCV	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	1,0±0,58 ^{ac}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b
CL	0,0±0,0 ^a	1,67±0,33 ^{ac}	1,0±0,58 ^a	4,33±0,33 ^{ad}	10,0±0,0 ^{bd}	10,0±0,0 ^{bd}	6,67±3,33 ^{ad}	9,33±0,67 ^{bcd}	10,0±0,0 ^{bd}	10,0±0,0 ^{bd}
OG	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	1,0±0,58 ^{ab}	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b
PA	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	3,67±1,86 ^{ab}	8,33±1,67 ^{ab}	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b	10,0±0,0 ^b
Plantas	MEME +Tween	0,6 mg mL ⁻¹	0,7 mg mL ⁻¹	0,8 mg mL ⁻¹	0,9 mg mL ⁻¹	1,0 mg mL ⁻¹	1,1 mg mL ⁻¹	1,2 mg mL ⁻¹	1,3 mg mL ⁻¹	1,4 mg mL ⁻¹
2^o ensaio										
LG	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	4,0±1,53 ^a	8,67±0,67 ^a	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}
LO	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,33±0,33 ^a	4,0±1,53 ^{ac}	8,67±0,67 ^{ac}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}
MA	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	8,67±1,33 ^{ac}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}	10,0±0,0 ^{bc}

AA: *Adenocalymna alliaceum*; AS: *Allium sativum*; AT: *Aloysia triphylla*; CCB: *Croton cajucara* morfotipo branca; CCV: *Croton cajucara* morfotipo vermelha; CL: *Curcuma longa*; OG: *Ocimum gratissimum*; PA: *Piper aduncum*; LG: *Lippia grata*; LO: *Lippia origanoides*; MA: *Mentha arvensis*. Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença ao nível de 5% de significância.

TABLE 3. Valores de concentrações efetivas (CE₅₀) dos óleos essenciais contra *Neoechinorhynchus buttnerae*, em diferentes tempos de exposição.

Óleos essenciais	Intervalo de concentrações (mg mL ⁻¹)	CE ₅₀ (95% IC)	R ²	CE ₅₀ (95% IC)	R ²	CE ₅₀ (95% IC)	R ²
		(mg mL ⁻¹)		(mg mL ⁻¹)		(mg mL ⁻¹)	
		2 horas		6 horas		24 horas	
<i>Adenocalymna alliaceum</i>	0,19-50	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Allium sativum</i>	0,19-50	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Aloysia triphylla</i>	0,19-50	3,35 (2,94-3,81)	0,99	1,88 (1,60-2,21)	0,98	ND	-
<i>Croton cajucara</i> (morfotipo branca)	0,19-50	3,51 (3,11-3,95)	0,97	2,72 (2,42-3,05)	0,97	1,49 (1,27-1,75)	0,97
<i>Croton cajucara</i> (morfotipo vermelha)	0,19-50	3,51 (3,11-3,95)	0,97	1,97 (1,79-2,16)	0,95	1,03 (0,95-1,11)	0,94
<i>Curcuma longa</i>	0,19-50	37,89 (29,22-49,14)	0,76	ND	-	ND	-
<i>Lippia grata</i>	0,6-1,4	1,38 (1,36-1,40)	0,71	0,96 (0,93-0,99)	0,89	0,86 (0,83-0,89)	0,89
<i>Lippia origanoides</i>	0,6-1,4	1,20 (1,17-1,23)	0,65	0,86 (0,85-0,87)	0,81	0,76 (0,73-0,78)	0,94
<i>Mentha arvensis</i>	0,6-1,4	ND	-	ND	-	0,66 (0,65-0,67)	0,69
<i>Ocimum gratissimum</i>	0,19-50	3,51 (3,11-3,95)	0,97	1,97 (1,79-2,16)	0,96	1,03 (0,95-1,11)	0,93
<i>Piper aduncum</i>	0,19-50	0,73 (0,63-0,84)	0,97	1,52 (1,34-1,73)	0,98	1,52 (1,34-1,73)	0,98

ND: não determinado

Capítulo 3

Óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Lippia grata* e *Lippia origanoides* tem eficácia no controle do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* em *Colossoma macropomum*

Artigo a ser submetido à revista: Aquaculture

Óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Lippia grata* e *Lippia origanoides* tem eficácia no controle do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* em *Colossoma macropomum*

Maria Inês Braga de Oliveira^{a,b}, Franmir Rodrigues Brandão^a, Bruna Carlos do Nascimento Barbosa^c, Maria Juliete Souza Rocha^a, Lorena Vieira de Matos^b, Damy Caroline de Melo Souza^d, Cláudia Majolo^e, Marcelo Róseo de Oliveira^e, Francisco Célio Maia Chaves^e, Edsandra Campos Chagas^{a,e}

^aPostgraduate Program on Fishery Sciences in the Tropics, Federal University of Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos 1200, Coroado I, 69067-005, Manaus, AM, Brazil

^bMorphology department, Federal University of Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos 1200, Coroado I, 69067-005, Manaus, AM, Brazil

^cUninorte Laureate International Universities, Av. Joaquim Nabuco 1469, Centro, 69020-030, Manaus, AM, Brazil

^dPostgraduate Program on Basic and Applied Immunology, Federal University of Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos 1200, Coroado I, 69067-005, Manaus, AM, Brazil

^eEmbrapa Amazônia Ocidental, AM-010, Km 29, Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM, Brazil

Corresponding author: Edsandra C. Chagas, Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brazil. E-mail: edsandra.chagas@embrapa.br

Resumo

O controle de helmintos gastrointestinais é um desafio na aquicultura e a aplicabilidade de produtos bioativos de plantas tem sido investigada como alternativa favorável ao meio ambiente e ao uso de quimioterápicos. Este estudo avaliou a eficácia anti-helmíntica dos óleos essenciais (OEs) de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum* no controle *in vivo* do acantocéfalo e *N. buttnerae* em *C. macropomum*, uma das principais espécies de peixe cultivadas no Brasil, mediante avaliação dos índices parasitários, parâmetros de crescimento, hematológicos, bioquímicos, enzimáticos e histopatológicos. Para o ensaio, juvenis de tambaqui (n=126), naturalmente infectados por *N. buttnerae*, foram distribuídos em sete tratamentos, com três repetições. Os tratamentos foram compostos por um controle e mais seis tratamentos com óleo essencial (OE), sendo eles: *L. grata* (0,86 e 1,72 g kg⁻¹), *L. origanoides* (0,76 e 1,52 g kg⁻¹) e de *O. gratissimum* (1,03 e 2,06 g kg⁻¹). Após 30 dias de alimentação com as dietas teste, o desempenho zootécnico dos peixes foi avaliado e as amostras de sangue e fígado coletadas para análises hematológicas, bioquímicas, enzimáticas e histopatológicas. Houve 100% de sobrevivência dos peixes tratados com OEs e redução na intensidade e abundância média parasitária dos peixes alimentados com dietas contendo OEs de *L. grata* (0,86 g kg⁻¹), *L. origanoides* (0,76 g kg⁻¹) e *O. gratissimum* (1,03 e 2,06 g kg⁻¹). O percentual médio de eficácia anti-helmíntica dos OEs variou entre 43,9 e 62,1%. Aumento nos níveis médios de proteínas totais e fosfatase alcalina foi registrado nas maiores concentrações de OEs das espécies de *Lippia* adicionados às dietas. No entanto, a manutenção dos níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), somado a maior frequência de danos leves a moderados no tecido hepático, com necrose focal pontual, sugere a influência da elevada intensidade e abundância média parasitária na variação bioquímica e enzimática dos peixes. De acordo com os indicadores morfofisiológicos avaliados e da redução significativa na intensidade e abundância média parasitária, os OEs de *L. grata* (0,86 g kg⁻¹), *L. origanoides* (0,76 g kg⁻¹) e *O. gratissimum* (1,03 e 2,06 g kg⁻¹) despontam como promissores como alternativa terapêutica no controle da acantocefalose em *C. macropomum*.

Palavras-chave: Eficácia, fisiologia, histopatologia, óleos essenciais, piscicultura, tambaqui

1. Introdução

Na criação intensiva de peixes, a disseminação e estabelecimento de parasitoses causadas por helmintos em elevada intensidade parasitária podem ter consequências prejudiciais à saúde dos animais cultivados com práticas deficientes de manejo e falta de planos de biossegurança (Bondad e Reantaso, 2005). Atualmente, tem sido observado surtos epizooticos causados por acantocéfalos *Neoechinorhynchus buttnerae* em *Colossoma macropomum* (tambaqui), a principal espécie de peixe nativa cultivada no Norte do Brasil e em outras regiões da Amazônia (Silva-Gomes et al., 2017; Pereira e Morey, 2018; Chagas et al., 2019; Valladão et al., 2020). Obstrução do lúmen intestinal, comprometimento dos vilos na camada mucosa, espessamento e necrose na camada muscular e infiltração leucocitária foram relacionadas a elevadas taxas de infecção por *N. buttnerae* (Jerônimo et al., 2017; Matos et al., 2017; Aguiar et al., 2018), assim como redução no crescimento dos peixes com prejuízos econômicos à produção (Silva-Gomes et al., 2017).

Considerando que o manejo de doenças na aquicultura deve ser abordado de maneira favorável ao organismo e ao meio ambiente, a aplicabilidade de produtos bioativos derivados de plantas medicinais em doenças da aquicultura tem sido investigada (Van Doan et al., 2020). Dentre os compostos vegetais estudados, os óleos essenciais e suas moléculas estão entre as alternativas mais promissoras para controle e tratamento, visando garantir a manutenção da saúde dos peixes cultivados (Franz e Novak, 2010; Ribeiro et al., 2018; Tavares-Dias, 2018; Chagas et al., 2020).

O controle de helmintoses gastrointestinais é um desafio na piscicultura, considerando a dificuldade de acesso dos potenciais agentes terapêuticos ao lúmen do intestino, sítio comum de localização de endohelmintos nos peixes (Soler-Jimenes, 2017). Assim, a administração oral de óleos essenciais (OEs) por meio da adição a dieta dos peixes associada à procedimentos e técnicas que garantam a eficácia terapêutica, tem sido uma importante alternativa visando o controle de endoparasitos em peixes infectados (Sutilli et al., 2017; Corral et al., 2018; Tavares-Dias, 2018; Costa et al., 2020).

Para a validação da eficiência terapêutica de óleos essenciais e seus compostos bioativos deve-se avaliar os potenciais efeitos sobre o desempenho e condição geral na saúde dos peixes, analisando as respostas de crescimento, fisiológicas e histopatológicas (Zheng et al., 2009; Brum et al., 2018; Ribeiro et al., 2018; Brum et al., 2018; Costa et

al., 2020). Estudos enzimáticos são imprescindíveis para o melhor entendimento da fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes, possibilitando ajustes mais precisos na elaboração de dietas (Braga et al., 2004). Além disso, alterações teciduais no fígado são consideradas indicadoras do entendimento do estado nutricional dos peixes alimentados com dietas contendo óleos essenciais e os efeitos desses como aditivos alimentares (Karatat et al., 2020).

Estudos sobre plantas medicinais da Amazônia com potencial atividade anti-helmíntica apontam eficácia *in vitro* (Salaro, 2018; Santos et al., 2018; Costa et al., 2020) e *in vivo* (Costa et al., 2020) de alguns óleos essenciais incorporados na dieta dos peixes no controle da acantocéfaloze em *C. macropomum*. Porém, a atividade antihelmíntica de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*, relatada como promissora contra helmintíases em peixes (Soares et al., 2017; Boijink et al., 2016; Barriga et al., 2020), não tem sido testada no controle e tratamento de infecção por *N. buttnerae* no cultivo de *C. macropomum*. Um recente screening com 11 espécies de OEs demonstrou eficácia *in vitro* contra *N. buttnerae* (Oliveira, 2020). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia anti-helmíntica dos óleos essenciais de *L. grata*, *L. origanoides* e *O. gratissimum* na dieta de *C. macropomum* para o controle de *N. buttnerae*, avaliando os índices parasitários, parâmetros de crescimento, fisiológicos e histopatológicos.

2. Materiais e métodos

2.1. Obtenção dos peixes e aclimação

Juvenis de *C. macropomum* (n = 126), com peso médio de $173,5 \pm 4,5$, naturalmente infectados por *N. buttnerae* foram adquiridos de uma piscicultura comercial do município de Manaus, estado do Amazonas (Brasil) e aclimatados no setor de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM (Brasil), por duas semanas em tanques de polietileno de 1.000 L com sistema de aquecimento de água e aeração constante. Durante esse período, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial contendo 32% de proteína bruta até saciedade aparente.

Este estudo foi desenvolvido com a aprovação de seu protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental (protocolo 03/2018).

2.2. Preparo das dietas experimentais

Para o preparo de 1 kg de ração experimental com OE, uma solução foi preparada com 300 mL de álcool etílico 70% comercial (diluyente), 7,5 g do polímero de etilcelulose e as concentrações usadas para os OEs de *L. grata*, *L. origanoides* e *O. gratissimum*, são baseadas em resultados de ensaios *in vitro* determinados por Oliveira (2020). Nas dietas-controle foram adicionados apenas álcool etílico 70% e etilcelulose. Após a adição de cada solução por aspersão sobre os pellets da ração sob agitação constante, para distribuição uniforme do produto, procedeu-se a secagem com auxílio de um difusor; as rações foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenados em ambiente escuro sob refrigeração. Um dia antes da alimentação, a quantidade necessária de cada ração, estimada conforme a biossoma dos peixes em cada unidade experimental, foi pesada e armazenada até o momento do fornecimento.

O método de extração e caracterização química dos óleos essenciais estão descritos em Chagas et al. (2020). A composição química dos OEs de *L. grata*, *L. origanoides* e *O. gratissimum*, incorporados às dietas são apresentadas na Tabela 1. Todos os procedimentos envolvidos na coleta das plantas foram aprovados pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) (Processos nº. A643761 e AB1F0FA).

2.3. Delineamento experimental

Após o período de aclimação, os peixes foram distribuídos em tanques de quantos 1000L, seguindo delineamento experimental inteiramente casualizado usando com sete tratamentos, sendo um controle, sem adição de óleos essenciais (0 g kg^{-1}) e duas concentrações de cada óleo essencial avaliado (em g kg^{-1} de peso vivo dia^{-1}): *L. grata* ($0,86 \text{ g kg}^{-1}$ e $1,72 \text{ g kg}^{-1}$), *L. origanoides* ($0,76 \text{ g kg}^{-1}$ e $1,52 \text{ g kg}^{-1}$) e *Ocimum gratissimum* ($1,03 \text{ g kg}^{-1}$ e $2,06 \text{ g kg}^{-1}$), com três repetições cada. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, na quantidade estimada de acordo com a biomassa dos peixes (3%) em cada unidade experimental, durante 30 dias.

Durante os experimentos, os parâmetros de qualidade da água foram monitorados e não sofreram alterações entre os tratamentos: oxigênio dissolvido ($5,2 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$) e temperatura ($28,1 \pm 0,04 \text{ }^\circ\text{C}$), medidos com oxímetro digital (YSI Pro20, YSI Inc., USA), pH ($5,8 \pm 0,23$) com uso de pHmetro digital (YSI F-1100, YSI Inc.,

USA), alcalinidade ($4,95 \pm 0,341 \text{ mg L}^{-1}$) e dureza ($8,63 \pm 0,47 \text{ mg L}^{-1}$) por titulometria e amônia total ($0,694 \pm 0,0297 \text{ mg L}^{-1}$) pelo método de endofenol, de acordo com APHA (1998).

2.4. *Parâmetros de crescimento*

Com os dados de peso e comprimento, obtidos nas biometrias dos peixes no início e no final de 30 dias de alimentação dos peixes, foram calculados os índices de desempenho zootécnico: comprimento final, ganho de peso (peso final-peso inicial), taxa de crescimento específico (TCE: $100 \times [(\ln \text{peso final} - \ln \text{peso inicial}) / t]$), taxa de conversão alimentar (TCA: $(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}$), além do registro do percentual de sobrevivência.

2.5. *Determinação dos parâmetros sanguíneos de Colossoma macropomum*

Após 30 dias de alimentação com as dietas experimentais, os peixes (6 peixes por repetição) foram anestesiados com benzocaína (100 mg L^{-1}) para coleta sanguínea por punção do vaso caudal usando seringas contendo EDTA (10%), e as amostras foram divididas em duas alíquotas. Uma alíquota sanguínea foi usada para obtenção do plasma após centrifugação, que foi utilizada para a determinação da glicose plasmática, pelo método da glicose oxidase e leitura de absorbância em 520 nm; proteínas totais, por método colorimétrico pela reação do biureto e leitura de absorbância em 545 nm; alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em modo cinético, com leitura de absorbância em 340 nm e 405 nm, respectivamente e fosfatase alcalina (ALP) por método colorimétrico e leitura de absorbância em 590 nm. Em todas as análises foram usados kits comerciais (LabTest®) e todas as leituras de absorbâncias realizadas em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA).

Outra alíquota do sangue foi utilizada para determinação dos parâmetros eritrocitários. Para o hematócrito (Ht) as amostras de sangue foram transferidas para tubos de microhematócrito heparinizados e centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos em centrífuga para microhematócrito (FANEM Mod. 207N), e a leitura do porcentual (%) de sedimentação feita com o auxílio de uma escala. A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada segundo o método da cianometahemoglobina, descrito por Kampen & Zijlstra (1964). Para a contagem do número de eritrócitos (RBC), as amostras de sangue foram diluídas em solução de formol citrato na

proporção 1:200 (v/v). A contagem das células vermelhas circulantes (RBC) foi feita em uma câmara de Neubauer. O número total de eritrócitos foi expresso em milhões de células por microlitro de sangue ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$). Equações hematimétricas de Wintrobe (1934) foram utilizadas para determinação das constantes corpusculares, como o volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

2.6. Avaliações parasitológicas

Uma prospeção inicial para confirmação da presença de *N. buttnerae* no intestino de *C. macropomum*, resultou na intensidade média de $772,9 \pm 147,5$ parasitos/peixe comprovando a elevada taxa de infecção.

Para avaliar a eficácia dos OEs, 18 peixes de cada foram coletados após 30 dias, submetidos a anestesia profunda com benzocaína (250 mg L^{-1}), seguida pela eutanásia por secção medular (CONCEA, 2018) para realização da necropsia, com a coleta do intestino e fixação em formol (5%). Posteriormente, os acantocéfalos foram quantificados em estereomicroscópio (Leica, EZ4). Com esses valores foram calculados os índices parasitários de prevalência, intensidade média e abundância média da infecção, de acordo com Bush et al. (1997). A eficácia dos tratamentos com óleos essenciais foi calculada de acordo com a fórmula: $E = \text{NMPC} - \text{NMPT} \times 100/\text{NMPC}$ (E: eficácia, MNPC: número médio de parasitos do controle, MNPT: número médio de parasitos do tratamento) (Dotta et al., 2015).

2.7. Análises histopatológicas

Fragmentos do fígado de doze peixes de cada tratamento foram coletados e fixados em formol 5% tamponado, onde permaneceram por 24 horas. Após, as amostras foram submetidas às seguintes etapas do processamento histológico: desidratação em séries crescentes de álcool, diafanização em xilol e impregnação em parafina líquida a 60°C . Na sequência, as amostras foram incluídas em blocos de parafina solidificada para obtenção por microtomia das secções histológicas de 7 micras (2 secções por peixe; 36 e 246 no total). Os danos histológicos foram semiquantitativamente avaliados usando o índice de alteração histopatológica (IAH) e o valor médio da alteração (VMA), adaptados a partir das metodologias descritas por Schwaiger et al. (1997) e Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994).

2.8. Análises estatísticas

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Os valores médios de desempenho zootécnico dos peixes, dos parâmetros hematológicos, bioquímicos, enzimáticos e histopatológicos foram avaliados por ANOVA, seguida por teste de Tukey ou por análise de Kruskal-Wallis seguida por teste de Dunn, quando não verificada a normalidade dos dados. Diferença nos valores médios de intensidade parasitária, dos tratamentos em relação ao controle, foi verificada por análise de Kruskal Wallis seguida do método de Barlett. Em todos os testes foi considerada diferença quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Intensidade parasitária e eficácia anti-helmíntica dos óleos essenciais incorporados à dieta de *Colossoma macropomum*

O efeito dos OEs adicionados às rações nos índices parasitários e eficácia dos tratamentos estão representados na Tabela 2. A análise parasitológica revelou que a prevalência foi de 100% 30 dias de alimentação com os OEs. Valores significativamente menores ($p < 0,05$) de intensidade média por *N. buttnerae* no intestino dos peixes foram obtidos nos tratamentos com as menores concentrações de OEs de *L. grata* ($0,86 \text{ g kg}^{-1}$) e *L. origanoides* ($0,76 \text{ g kg}^{-1}$) e com as duas concentrações do OE de *O. gratissimum* ($1,03 \text{ g kg}^{-1}$ e $2,6 \text{ g kg}^{-1}$), em relação aos peixes do grupo controle. Os tratamentos com os OEs de *L. origanoides* ($0,76 \text{ g kg}^{-1}$) e *O. gratissimum* ($2,06 \text{ g kg}^{-1}$) apresentaram menor amplitude de variação nos valores de intensidade da infecção. Quanto ao efeito anti-helmíntico dos tratamentos com os OEs, o percentual médio de eficácia entre os tratamentos variou de 43,9 a 62,1%, mas não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 2). A maior eficácia (62,1%) no controle de *N. buttnerae* foi com o OE de *L. grata* ($0,86 \text{ g kg}^{-1}$).

3.2. Parâmetros de desempenho zootécnico

Quanto aos parâmetros de desempenho zootécnico dos peixes, após 30 dias de alimentação, os valores médios de comprimento padrão (cm) foram significativamente menores ($p < 0,05$) nos peixes alimentados com dietas contendo OE de *L. origanoides* na maior concentração ($1,52 \text{ g kg}^{-1}$) em relação ao controle. Com este mesmo tratamento,

valores significativamente menores ($p < 0,05$) de peso médio e ganho de peso médio foram observados, tanto em relação ao controle quanto em relação aos demais tratamentos. Quanto a taxa de crescimento específico (TCE), os valores médios variaram mas não houve diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$). O menor valor médio da taxa de conversão alimentar (TCA) foi obtido no tratamento com a menor concentração do OE de *L. origanoides*, no entanto sem diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle e aos demais tratamentos. O fator de condição dos peixes variou de 0,99 a 1,03 e a sobrevivência dos peixes foi de 100% ao final do período de alimentação (Tabela 3).

3.3. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Quanto aos parâmetros hematológicos, após 30 dias de alimentação com as dietas contendo os três óleos essenciais, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto ao Ht, assim como para a concentração de hemoglobina [Hb]. Para o Ht a variação foi em média de 31,8% a 35,1% e para Hb a variação foi entre 8,71 e 9,77 g dL⁻¹. Para o RBC observou-se valores significativamente menores ($p < 0,05$) nos peixes alimentados com dieta contendo 1,03 g kg⁻¹ de OE de *O. gratissimum* em comparação com o tratamento com 1,52 g kg⁻¹ OE de *L. origanoides*, e essa redução foi correlacionada negativamente com os valores de VCM ($r: -0,825$; $p < 0,0001$). Quanto aos valores das constantes corpusculares VCM e CHCM não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 4).

Quanto aos parâmetros bioquímicos, os níveis médios de glicose plasmática não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos com OEs e o grupo controle. Comparando entre os tratamentos com os OEs da mesma planta, somente para *L. origanoides*, os níveis médios de glicose foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no tratamento com a maior concentração de OE adicionado à ração (Figura 1A). Com relação aos valores de proteínas totais, estes foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no tratamento com 1,52g kg⁻¹ de *L. origanoides*, em comparação com o controle e com os tratamentos com OE da mesma planta na menor concentração (0,76 g kg⁻¹) e de *O. gratissimum*, em ambas as concentrações avaliadas (Figura 1B). Quanto aos níveis plasmáticos de albumina e triglicerídeos, valores significativamente maiores ($p < 0,05$) foram registrados no plasma dos peixes tratados com as maiores concentrações dos OEs de *L. grata* e *L. origanoides* em comparação com o controle e com a menor

concentração de *L. origanoides*. Os níveis de albumina e de triglicérides nestes tratamentos não diferiram entre si ($p>0,05$), mas o tratamento com a maior concentração de *L. origanoides* apresentaram valores significativamente maiores ($p<0,05$) que os níveis destes dois parâmetros registrados no tratamento com $1,03 \text{ g kg}^{-1}$ de *O. gratissimum* (Figura 1C e 1D).

3.4. Parâmetros enzimáticos

Os valores médios de atividade das enzimas hepáticas AST e ALT dos peixes tratados com OEs foram similares ($p>0,05$) aos do grupo controle (Figura 2). Quanto aos valores de ALP, maiores níveis plasmáticos ($p<0,05$) foram registrados nos tratamentos com *L. grata* e *L. origanoides* nas concentrações $0,86 \text{ g kg}^{-1}$ e $1,52 \text{ g kg}^{-1}$, respectivamente, em comparação com os valores médios de atividade dessa enzima registrados no grupo controle. Comparando entre os tratamentos com os OEs, os peixes alimentados com ração contendo OEs de *O. gratissimum*, nas duas concentrações testadas, tiveram valores médios de ALP significativamente menores ($p<0,05$) em relação aos tratamentos com OE das espécies de *Lippia* (Figura 2).

3.5. Avaliação histopatológica do fígado

Histologicamente, no fígado do tambaqui foi observado o parênquima hepático constituído por hepatócitos arredondados a poliédricos com núcleo basófilo grande, central, nucléolo evidente e citoplasma com aspecto granuloso ou vesicular, arranjados em cordões lineares na periferia dos capilares sinusoides de lúmen estreito, que confluem para a veia central (Figura 3A). Diferentes danos morfológicos hepáticos, dentre celulares, vasculares e teciduais foram observados nas amostras de fígado de tambaquis após 30 dias de tratamento com as dietas contendo OEs foram observados. Os danos mais frequentemente registrados foram os classificados como danos de grau I e II, com 57,12% e 40,62% de ocorrência, respectivamente (Tabela 5).

Dentre os danos de grau I os mais comuns foram: hipertrofia e vacuolização dos hepatócitos e a dilatação dos capilares sinusoides (Figura 3B); picnose nuclear, congestão vascular e rompimento celular foram os danos de grau II mais observados (Figura 3B). Apenas 2% do total de danos registrados corresponderam aos danos de grau 3; neste o dano observado foi a dissolução de pequenos grupos de hepatócitos e

perda da arquitetura normal do parênquima hepático, sem a associação com infiltração leucocitária e que correspondem a necrose focal (Figura 3D).

Considerando a frequência de ocorrência dos valores individuais de IAH, observa-se que na maioria dos tratamentos os mesmos se encaixaram entre 21 a 100 na escala de danos, correspondentes a alterações moderadas a graves, porém reparáveis; a exceção foi no tratamento com OEs de *L. origanoides* com 1,52 g kg⁻¹ em que valores acima de 100 de IAH, indicativos de danos graves e irreversíveis no tecido hepático, foram mais frequentes (Figura 4). Neste tratamento os valores médios de IAH foram significativamente maiores que a média registrada para o controle e para os tratamentos com o OE de *O. gratissimum* (Figura 5A). Quanto ao VMA (Valor Médio da alteração), não houve diferença entre os tratamentos, com valores médios entre 1,03 e 1,35, indicativos de ocorrência de lesões pontualmente localizadas no órgão (Figura 5B).

4. Discussão

No presente estudo, nas plantas do gênero *Lippia*, os monoterpenos carvacrol e p-cimeno foram os compostos com maior percentual em seus óleos essenciais, enquanto em *O. gratissimum* cineol e eugenol foram os compostos majoritários. Terpenos e terpenoides constituem em geral o componente primário dos óleos essenciais obtidos das plantas e explorados como antihelmínticos. Além disso muitos terpenos são seguros e aprovados para aplicação em alimentos, em cosméticos e na indústria farmacêutica (Mirza et al., 2020).

A eficácia anti-helmíntica contra *N. buttnerae* em *C. macropomum*, com os OEs de *L. grata* (de 62,1% e 50,7% com 0,86 e 1,72 g kg⁻¹, respectivamente) e de *L. origanoides* (61,8% e 43,8% com 0,76 e 1,52 g kg⁻¹, respectivamente) foi similar à eficácia descrita por Costa et al. (2020) para *C. macropomum* alimentados com ração suplementada com 1,44 e 2,88 g kg⁻¹ de OE de *Lippia alba*. Além disso, o desempenho dos peixes não foi afetado pela intensidade parasitária. Portanto, tais concentrações de *L. grata* e *L. origanoides* adicionadas na dieta de *C. macropomum* podem ser uma alternativa no controle da acantocefalose causada por *N. buttnerae*.

No presente estudo o efeito anti-helmíntico do OE de *O. gratissimum* foi pela primeira vez avaliado no controle da infecção *N. buttnerae* em tambaqui, com redução da intensidade média da infecção, aproximadamente 60% de eficácia e manutenção na performance de crescimento dos peixes, após 30 dias de alimentação. Gayatri e Rajani

(2014) relataram também bons resultados no crescimento do bagre *Clarias batrachus* alimentados por 30 dias com dieta suplementada com extrato das folhas de *O. gratissimum*. Estudos com os OEs desta planta mostraram significativa atividade antihelmíntica contra monogenóides, sem indicativo de estresse fisiológico além de efeitos antioxidantes nos peixes (Bandeira Jr et al., 2017; Boijink et al., 2016); segundo os autores, estes produtos à base de plantas aparecem como alternativas sustentáveis e eficazes às drogas convencionais e/ou produtos químicos para controle de doenças e profilaxia na aquicultura, sendo o OE da alfavaca um ingrediente seguro para ser usado como antihelmíntico natural em peixes de cultivo.

Com relação aos parâmetros hematológicos, nenhuma alteração significativa nos níveis de Ht, Hb e RBC, assim como nas constantes corpusculares VCM, HCM e CHCM foi observada com o uso dos óleos essenciais das espécies de *Lippia* e de *O. gratissimum* na dieta, em comparação com o controle. A correlação negativa entre o valor médio de RBC e os valores médios das constantes VCM e HCM, observados nos peixes alimentados com $1,03 \text{ g kg}^{-1}$ de *O. gratissimum*, indica a ocorrência de ajustes morfológicos onde a redução no número de eritrócitos é compensada pelo aumento no volume dos eritrócitos e de conseqüentemente mais espaço para hemoglobina e portanto, sem comprometimento da troca dos gases respiratórios, a principal função desses elementos no sangue circulante (Tavares-Dias e Moraes, 2010; Ranzani-Paiva et al., 2013) e manutenção da homeostase. Esses mecanismos compensatórios também foram relatados nos peixes tratados com ração com adição dos OEs de *L. alba* em *C. macropomum* (Costa et al., 2020) e *O. gratissimum* em *C. batrachus* (Gaiatri e Rajani, 2014). Melhora na performance de desempenho ou nas variáveis imunológicas em peixes também foram relatadas em ensaios com óleos essenciais de distintas fontes vegetais, tais como: *Mentha piperita* e *Zingiber officinale* (Costa et al., 2020), *Piper aduncum* (Corral et al., 2018), *Myrtus communis* e *Satureja khuzistanica* (Mohamad Sei, 2016) e *Aloysia triphylla* (De Souza et al., 2017).

Quanto aos parâmetros bioquímicos e enzimáticos, destaca-se o aumento significativo nos níveis de proteínas totais e fosfatase alcalina nos peixes alimentados com as maiores concentrações do OE de *L. origanoides*; neste tratamento a menor eficácia e, portanto, a manutenção elevada na taxa de infecção por *N. buttnerae* foram registrados. Souza (2019) ao avaliar respostas imunes associadas a essa relação parasito-hospedeiro, relata que o aumento nos níveis de fosfatase alcalina e proteínas totais no

soro e no muco intestinal de tambaqui parasitado por *N. buttnerae*, reflete a influência da infecção sobre a resposta imune inata e sistêmica do hospedeiro. Concentrações de proteínas plasmáticas aumentadas em tambaqui também foram relatadas por Soares et al. (2016, 2017) após banho terapêutico com óleos essenciais de *L. origanoides* e *L. alba* com baixa eficácia *in vivo* contra helmintos monogenoídeos.

Além das proteínas totais, os níveis plasmáticos de albumina também aumentaram com 1,62 g kg⁻¹ do OE de *L. origanoides* e 1,52 g kg⁻¹ do OE de *L. grata*. Essas, assim como maior parte das proteínas plasmáticas são produzidas pelos cordões de hepatócitos que compõem o parênquima hepático (Ross e Pawlina, 2016) e variações nos níveis destas proteínas podem refletir o status funcional do órgão. Como nestes tratamentos, maior ocorrência de necrose, um dano grave e irreparável foi observado no tecido hepático, indicados pelo índice de alteração histopatológica (IAH), a destruição celular dos hepatócitos levaria ao desacoplamento da maquinaria de síntese proteica e consequente redução nos níveis séricos dessas proteínas (Bera et al., 2020). No entanto o valor médio de alteração (VMA) indicou a localização pontual e não extensiva dos focos de necrose, que provavelmente não compromete a função hepática, o que é compatível com o aspecto macroscópico saudável do órgão.

Alguns autores relataram redução nos níveis plasmáticos das enzimas aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT) como efeito promotor da atividade hepática em resposta a suplementação dietária com produtos naturais na dieta de peixes (Akrami et al., 2015; Karata et al., 2020; Yousefi et al., 2020). Os resultados da atividade dessas enzimas entre os tratamentos e o controle, no presente estudo, mostram que esses OEs não têm efeito hepatoprotetor, pois os níveis de AST e ALT não reduziram no plasma, mas também não aumentaram, indicando o não comprometimento da função hepática normal, já que a atividade sérica destas aminotransferases é aumentada com injúrias no tecido hepático (Contreras-Zentella et al., 2016).

Assim pode-se inferir ser mais provável que a manutenção elevada na intensidade média parasitária observada e não a possível toxicidade dos óleos essenciais das espécies de *Lippia* nas maiores concentrações, que explicam essas variações bioquímicas e enzimáticas. Por outro lado, os níveis significativamente menores desses perfis bioquímicos nos peixes tratados com OEs de *O. gratissimum* e com as menores concentrações dos OEs *L. grata* (0,86 g kg⁻¹) e *L. origanoides* (0,76 g kg⁻¹), todos com

redução significativa na intensidade média parasitária, apontam para a melhor eficiência terapêutica de seus óleos essenciais no controle da acantocefalose em tambaqui.

5. Conclusões

Os óleos essenciais das espécies de *L. grata* (0,86 g kg⁻¹) e *L. origanoides* (0,76 g kg⁻¹) e *O. gratissimum* (1,03 e 2,06 g kg⁻¹) podem ser usados na dieta de *C. macropomum* para controlar e tratar infecções por *N. buttnerae*. Além disso, considerando a demanda atual por fontes alternativas para o controle dessa acantocefalose em *C. macropomum*, os principais compostos desses OEs devem ser testados isolados e em combinações para o entendimento de possíveis efeitos sinérgicos e melhora na eficácia terapêutica contra *N. buttnerae*.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (MP2 01.02.09.003.00.00) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas - FAPEAM (Universal Amazonas 002/2018 e Amazonas Estratégico 004/2018) pelo apoio financeiro. Aos assistentes Iraní Moraes, Edson Paiva Afonso e José Marconde da Costa e Silva, da Embrapa Amazônia Ocidental, pela assistência técnica durante os experimentos. À FAPEAM pelo apoio financeiro para a tradução do manuscrito (PAPAC 005/2019, Processo 062.00847.2019).

Referências

- AGUIAR, L. S. et al. Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Parasitology Research*, v. 117, n. 6, p. 1689-1698, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5840-8>.
- AKRAMI, R. et al. Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune response and hemato-biochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 45, n. 2, p. 828-834, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.06.005>.
- BERA, K. K. et al. Triclosan induces immunosuppression and reduces survivability of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* during the challenge to a fish pathogenic bacterium *Edwardsiella tarda*. *Environmental Research*, v. 186, p. 109575, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109575>.

BONDAD-REANTASO, M. G. et al. Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary parasitology*, v. 132, n. 3-4, p. 249-272, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>.

BOIJINK, C. L. et al. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture*, v. 457, p. 24-28, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.010>.

BRAGA, L. G. T. et al. Atividade da tripsina em rã-touro na fase pós-metamórfica. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 4, p. 821-827, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982004000400001>.

BRUM, A. et al. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, v. 490, p. 98-107, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.040>.

BUSH, A. O. et al. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology*, v. 83, p. 575-583, 1997. <https://doi.org/10.2307/3284227>.

CHAGAS, E. C. et al. *Neoechinorhynchus buttnerae* parasitic infection in tambaqui (*Colossoma macropomum*) on fish farms in the state of Amazonas. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 45, n. 2, p. 1-6, 2019. DOI: 10.20950/1678-2305.2019.45.2.499.

CHAGAS, E. C. et al. Composition of essential oils of *Mentha* species and their antimicrobial activity against *Aeromonas* spp. *Journal of Essential Oil Research*, p. 1-7, 2020. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1741457>.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Diretriz da prática de eutanásia em animais incluídos em atividades de ensino ou de pesquisa científica. 2018. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf.

CONTRERAS-ZENTELLA, M. L.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. Is liver enzyme release really associated with cell necrosis induced by oxidant stress? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, ID. 3529149, 2016.

CORRAL, A. C. T. et al. Control of *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) in juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) by the oral application of essential oil of *Piper aduncum*. *Aquaculture*, v. 494, p. 37-44, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.062>.

COSTA, C. M. S. et al. Efficacy of the essential oils of *Mentha piperita*, *Lippia alba* and *Zingiber officinale* to control the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma macropomum*. *Aquaculture Reports*, v. 18, p. 1-8, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100414>

DE SOUZA, R. C. et al. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. *Microbial Pathogenesis*, v. 113, p. 29-33, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.013>.

DOTTA, G. et al. Dietary supplementation with própolis and *Aloe barbadensis* extracts on the hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.24, p.66-71, 2015.

FRANZ, C. AND NOVAK, J. (2010) Sources of Essential Oils. In: Baser, K.H.C. and Buchbauer, G., Eds., *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, CRC Press/ Taylor & Francis Group, Boca Raton, 39-82, 2010.

GAYATRI N. AND K.S. RAJANI. 2014. Immunomodulatory effect of *Ocimum gratissimum* Linn leaf extract on a common fish, *Clarias batrachus* Linn. *International Journal of Drug Delivery* 6:268–278

JERÔNIMO, G. T. et al. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: a pathological approach. *Aquaculture*, v. 469, p. 124-127, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.027>.

KAMPEN, E. J.; ZIJLSTRA, W. G. Standardization of haemoglobinometry. In: Boroviczény, C. G. (Ed.). *Erythrocytometric Methods and their standardization*. *Bibliotheca Haematologica*, v. 18, p. 68-72, 1964.

KARATAŞ, T. et al. Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on growth, blood biochemistry, immunity, antioxidant, digestive enzymes and liver histopathology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Nutrition*, v. 26, n. 5, p. 1533-1541, 2020. <https://doi.org/10.1111/anu.13100>.

NAHAK, G.; SAHU, R. K. Immunomodulatory Effect of *Ocimum gratissimum* Linn. Leaf Extract on a Common Fish *Clarias batrachus* Linn. *International Journal of Drug Delivery*, v. 6, n. 3, p. 268-278, 2014. ISSN: 0975-0215.

MATOS, L. V. et al. Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. *Parasitology research*, v. 116, n. 3, p. 1029-1037, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5384-3>.

MIRZA, Z. et al. Anthelmintic Activity of Yeast Particle-Encapsulated Terpenes. *Molecules*, v. 25, n. 13, p. 2958, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25132958>.

MOHAMADI SAEI, M. et al. Effects of dietary savory and myrtle essential oils on growth, survival, nutritional indices, serum biochemistry, and Hematology of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fry. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 47, n. 6, p. 779-785, 2016. <https://doi.org/10.1111/jwas.12306>.

OLIVEIRA, M.I.B. Potencial *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais contra a infecção por *Neoechinorhynchus buttnerae* em tambaqui *Colossoma macropomum*. . Doutorado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, 2020.

PEREIRA, J.N.; MOREY, G.A.M. First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacantocephala: Neoechinorhynchidae) on *Colossoma macropomum* (Characidae) in a fish farm in Roraima, Brazil. *Acta Amazônica*, v. 48(1), p. 42-45, 2018.

POLEKSIĆ, V.; MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford: Fishing News Books, p. 339-52, 1994.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. Métodos para análise hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, p. 140, 2013.

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

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. *Histologia: texto e atlas, correlações com Biologia celular e molecular*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1000, 2016.

SALARO, R. E. G. Atividade in vitro de óleos essenciais contra *Neoechinorhynchus buttnerae* de tambaqui e seus efeitos no hospedeiro. 2018. [Cited 29 March 2020.] Available from URL: <http://hdl.handle.net/11449/154582>.

SANTOS, W. B. et al. *In vitro* efficacy of essential oils of Piperaceae species in the control of acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae*. *Revista brasileira de higiene e sanidade animal*, v. 12, p. 460-469, 2018.

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

SILVA-GOMES, A. L. et al. The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) outbreaks on productive and economic performance of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), reared in ponds. *Latin american journal of aquatic research*, v. 45, n. 2, p. 496-500, 2017. <http://dx.doi.org/10.3856/vol45-issue2-fulltext-25>.

SOARES, B.V. et al. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture*, v. 452, p. 107-114, 2016.

SOARES, B. V., et al. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, v. 469, p. 72-78, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001>

SOLER-JIMÉNEZ, L. C., et al. Helminth parasites of finfish commercial aquaculture in Latin America. *Journal of Helminthology*, v. 91(2), p. 110-136, 2017.

SOUZA, D.C.M.; SANTOS, M.C.; CHAGAS, E.C. Immune response of teleost fish to helminth parasite infection. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 28, p. 533-547, 2019.

SOUZA, D.C.M. Avaliação da resposta humoral de tambaqui, *Colossoma macropomum*, infectado pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*. Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, 2019.

SUTILI, F.J.; GRESSLER, L.T.; PELEGRINI, L.F.V. *Clinostomum complanatum* (Trematode, Digenea): A parasite of birds and fishes with zoonotic potential in southern Brazil: A review. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 8(1), p. 99-114, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20140007>.

TAVARES-DIAS, MARCOS; MORAES, F. R. . Biochemical parameters for *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* (Characidae) and hybrid tambacu (*P. mesopotamicus* X *C. macropomum*). *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, p. 361-368, 2010.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 41, n. 4, p. 913-918, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>.

TAVARES-DIAS, M. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquatic Living Resources*, v. 31, p. 1-13, 2018.

VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, p. 351–369, 2018.

VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; JERÔNIMO, G.T.; SEIXAS, A.T. Challenges in the control of acanthocephalosis in aquaculture: special emphasis on *Neoechinorhynchus buttnerae*. *Reviews in Aquaculture*, 2020. doi:10.1111/raq.12386

VAN DOAN, H. SOLTANI, E.; INGELBRECHT, J. & SOLTANI, M. Medicinal herbs and plants: Potential Treatment of Monogenean Infections in Fish, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28:2, 260-282, DOI: 10.1080/23308249.2020.1712325, 2020.

WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, v. 51, n. 32, p. 32-49, 1934.

YOUSEFI, M. et al. The protective effects of dietary garlic on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient ammonia toxicity. *Aquaculture*, p. 735400, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735400>

ZHENG, Z. L. et al. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, v. 292, n. 3-4, p. 214-218, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.025>.

FIGURAS E TABELAS

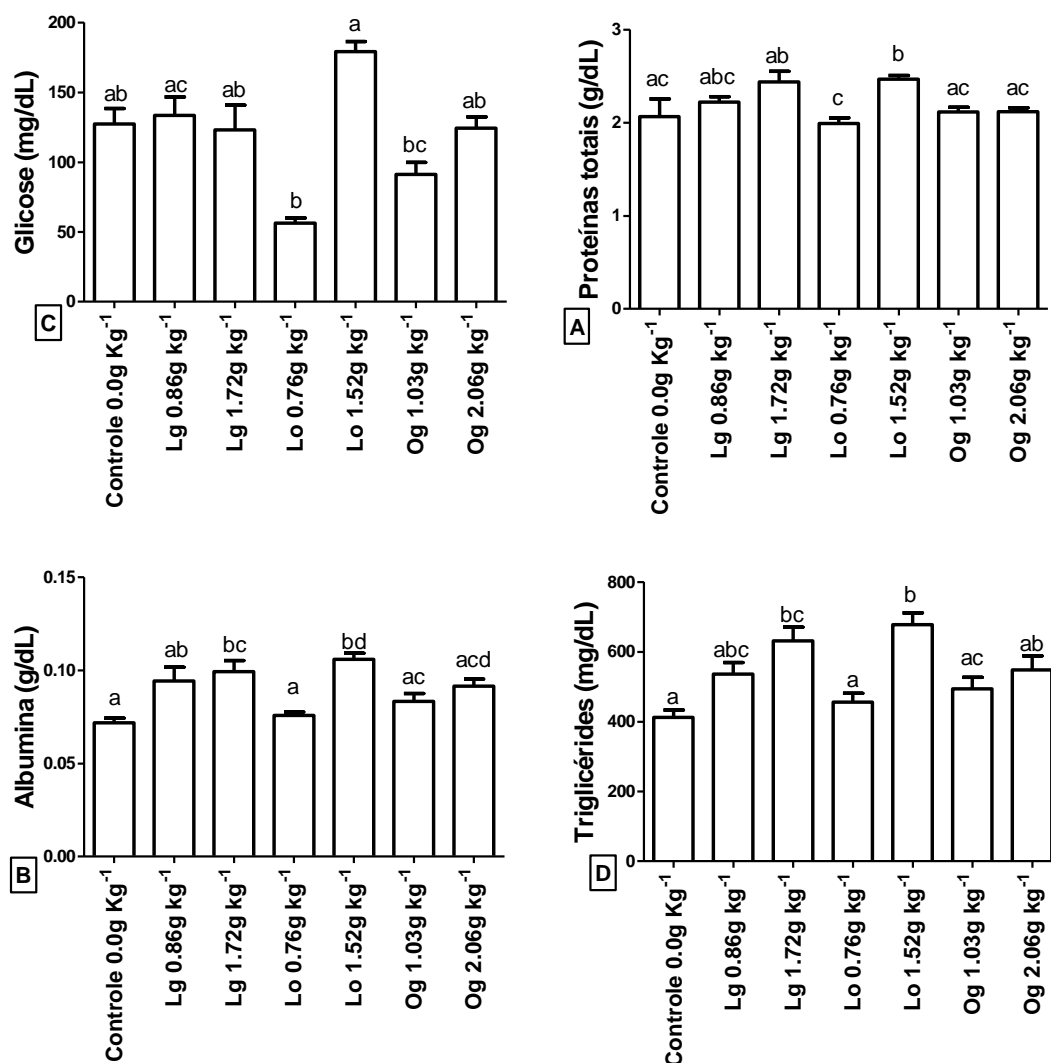


Figura 1. Valores médios de glicose (A), proteínas totais (B), albumina (C) e triglicérides (D) para *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus butnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa pelo teste de Dunn ($p > 0,05$). Lg = *Lippia grata*, Lo = *Lippia origanoides*, Og = *Ocimum gratissimum*.

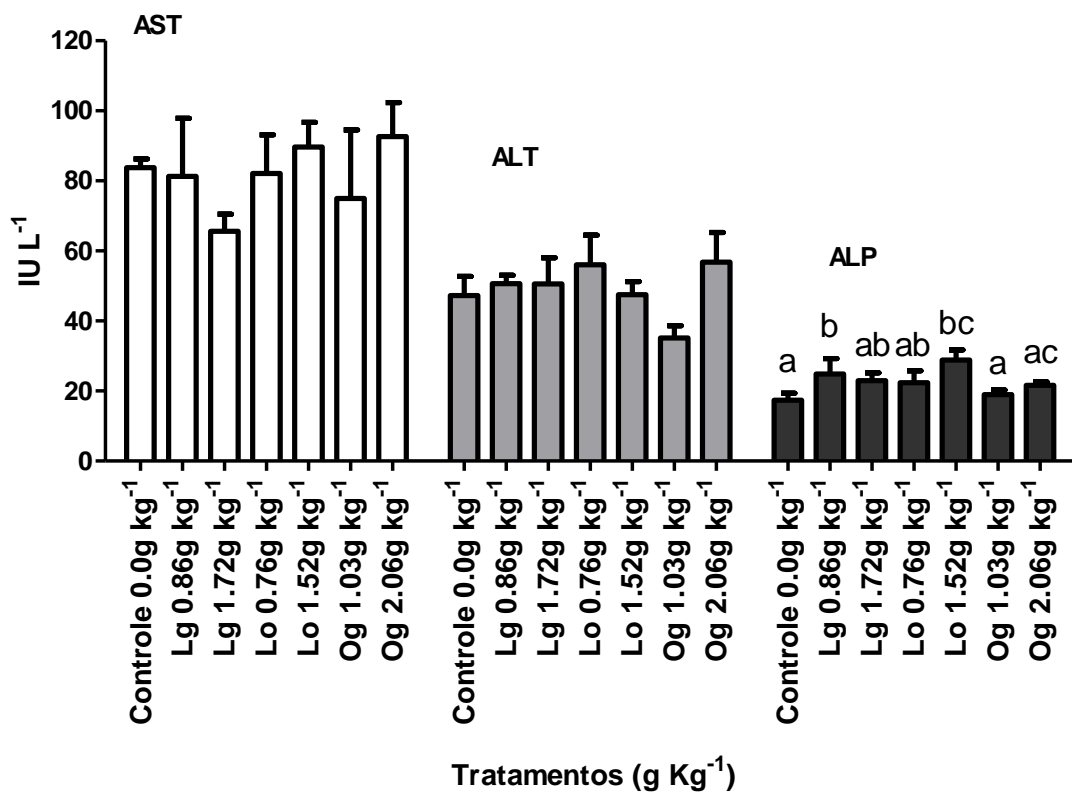


Figura 2. Valores de atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferas (AST), alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) para *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia organoides* e *Ocimum gratissimum*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Lg = *Lippia grata*, Lo = *Lippia organoides*, Og = *Ocimum gratissimum*.

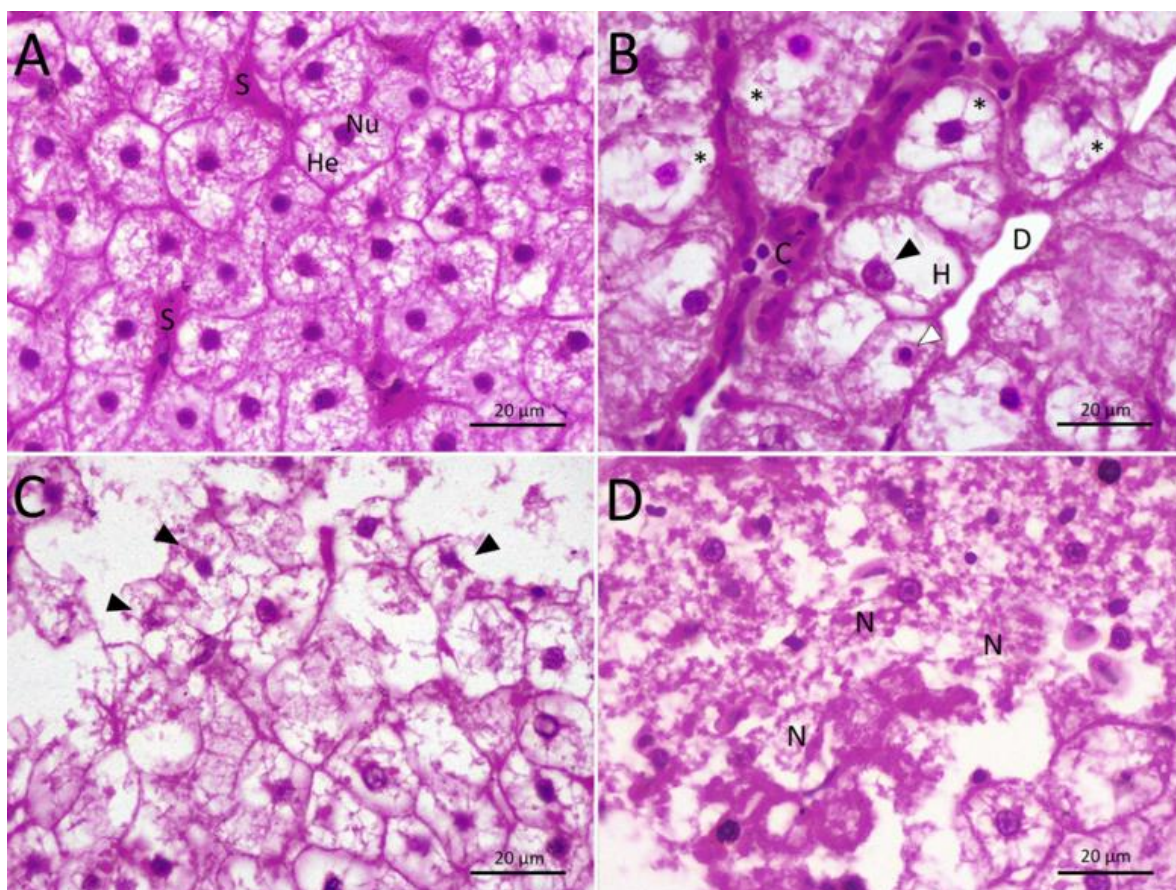


Figura 3. Identificação dos danos histopatológicos no fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* após 30 dias de tratamento com as dietas teste contendo óleos essenciais de *Lippia gratata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*. A: estrutura histológica do parênquima hepático: Hepatócitos (He) poliédricos organizados em cordões com núcleo central em torno dos capilares sinusoides (S); B: Danos de grau 1 mais comuns: hipertrofia (H) e vacuolização dos hepatócitos (*) e dilatação dos capilares sinusoides (D); C. Danos de grau 2 mais frequentes: rompimento celular (seta) de hepatócitos hipertrofiados com núcleos picnóticos; D. dano de grau 3: dissolução de pequenos grupos de hepatócitos e seus núcleos e perda da arquitetura normal do parênquima hepático, corresponde a necrose focal (N).

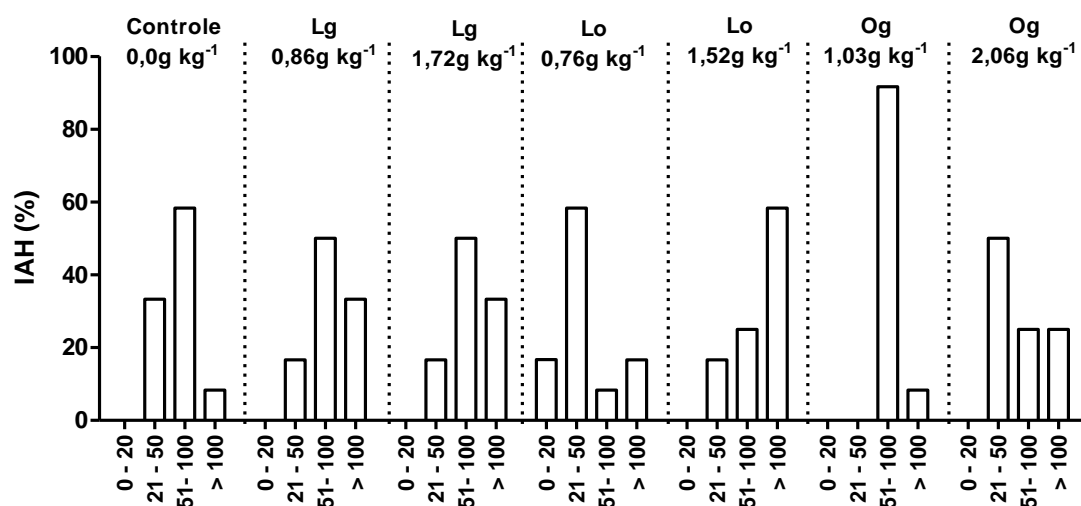


Figura 4. Frequência de ocorrência dos valores percentuais do índice de alteração histopatológica (IAH) por escala de dano (0-20 danos leves; 21-50 danos leves a moderados; 51-100 danos moderados a graves; >100 danos graves e irreparáveis) no tecido hepático de *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*. Lg = *Lippia grata*, Lo = *Lippia origanoides*, Og = *Ocimum gratissimum*.

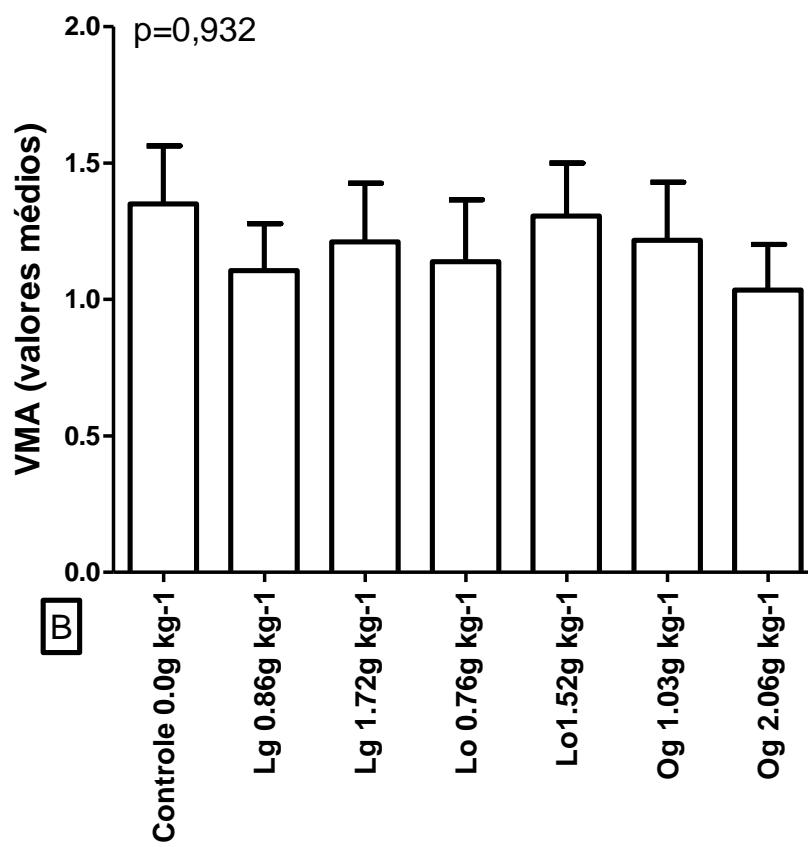
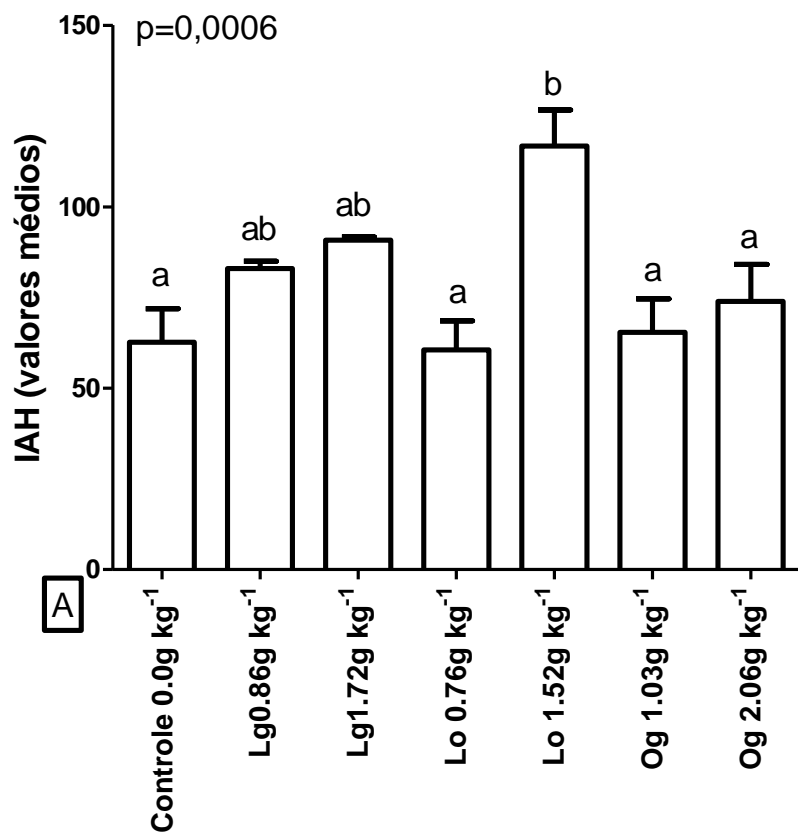


Figura 5. Frequência de ocorrência dos valores médios do índice de alteração histopatológica (IAH) (A) e do valor médio da alteração (VMA) (B) no tecido hepático de *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey $p < 0,05$. Lg = *Lippia grata*, Lo = *Lippia origanoides*, Og = *Ocimum gratissimum*.

Tabela 1. Percentual dos componentes químicos identificados nos óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*. IR: índice de retenção.

<i>Lippia grata</i>			<i>Lippia origanoides</i>			<i>Ocimum gratissimum</i>		
Compostos	Teor (%)	IR	Compostos	Teor (%)	IR	Compostos	Teor (%)	IR
1,8-cineol	39,5	1029	carvacrol	42,2	1302	<i>p</i> -cimeno	37,8	1023
eugenol	14,7	1355	<i>p</i> -cimeno	11,2	1022	Carvacrol	14,0	1301
β -selineno	12,6	1481	γ -terpineno	10,7	1055	γ -terpineno	11,6	1055
(<i>E</i>)-cariofileno	5,9	1414	timol, metil-éter	6,1	1232	Linalol	6,1	1099
β -pineno	4,2	974	(<i>E</i>)-cariofileno	5,1	1414	Mirceno	5,9	989
óxido de cariofileno	3,4	1577	biciclogermacreno	5,0	1491	α -tujeno	3,3	924
α -selineno	3,4	1490	timol	3,5	1292	α -terpineno	3,2	1015
α -terpineol	2,0	1188	α -terpineno	2,1	1015	timol	3,1	1292
linalol	1,9	1099	mirceno	1,8	989	timol, metil-éter	2,6	1232
limoneno	1,7	1026	1,8-cineol	1,4	1028	1,8-cineol	2,5	1028
α -pineno	1,4	931	aromadendreno	1,4	1433	(<i>E</i>)-cariofileno	1,8	1414
α -humuleno	1,1	1448	α -tujeno	1,3	924	β -pineno	1,4	975
7- <i>epi</i> - α -selineno	1,0	1512	α -humuleno	1,2	1448	terpinen-4-ol	1,4	1174
(<i>Z</i>)- β -ocimeno	0,9	1034	espatulenol	1,1	1572	α -pineno	1,4	931
sabineno	0,8	971	limoneno	0,8	1026	limoneno	1,1	1026

Tabela 2. Valores dos índices parasitários e da eficácia anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum* no controle da infecção por *Neoechinorhynchus buttnerae* em *Colossoma macropomum*.

Tratamentos	Prevalência (%)	Intensidade	Intensidade média	Abundância média	Eficácia (%)
Controle 0 g kg ⁻¹	100	174,0-947,7	634,1±129,7	634,1±129,7	-
Lg 0,86 g kg ⁻¹	100	156,3-371,7	240,3±41,3*	240,3±41,3*	62,1±2,44
Lg 1,72 g kg ⁻¹	100	79,3-434,3	312,8±61,4	312,8±61,4	50,7±7,26
Lo 0,76 g kg ⁻¹	100	175,7-326,3	242,3±25,1*	242,3±25,1*	61,8±5,48
Lo 1,52 g kg ⁻¹	100	52,0-539,3	355,9±71,2	355,9±71,2	43,8±8,21
Og 1,03 g kg ⁻¹	100	75,7-451,0	261,8±58,5*	261,8±58,5*	58,7±9,84
Og 2,06 g kg ⁻¹	100	177,3-378,0	254,4±32,2*	254,4±32,2*	59,8±7,53
P (Kruskal wallis)			0,047	0,047	0,438

* indicam diferença significativa em relação ao controle pelo método de Barlett ($p < 0,05$). Lg = *Lippia grata*, Lo = *Lippia origanoides*, Og = *Ocimum gratissimum*.

Tabela 3. Parâmetros de desempenho zootécnico de *Colossoma macropomum*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleo essencial de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*.

Tratamentos	Comp. final (cm)	Peso final (g)	Ganho de peso (g)	TCE (%)	TCA	Fator de Condição	Sobrevivência (%)
Controle 0 g kg ⁻¹	21,3±0,34 ^a	349,7±18,78 ^a	163,9±9,45 ^a	2,75±0,24	2,06±0,18	1,02±0,02	100
Lg 0,86 g kg ⁻¹	19,7±0,14 ^{ab}	272,7±8,17 ^a	115,5±12,48 ^{ab}	2,27±0,15	2,59±0,24	0,99±0,06	100
Lg 1,72 g kg ⁻¹	20,4±0,35 ^{ab}	307,6±16,03 ^a	120,2±21,41 ^{ab}	2,54±0,36	2,85±0,52	1,03±0,02	100
Lo 0,76 g kg ⁻¹	20,9±0,23 ^a	332,3±14,61 ^a	165,2±13,44 ^a	2,79±0,05	1,99±0,32	0,99±0,02	100
Lo 1,52 g kg ⁻¹	18,8±0,35 ^b	257,0±16,39 ^b	104,2±16,03 ^b	2,28±0,14	2,77±0,33	1,01±0,05	100
Og 1,03 g kg ⁻¹	20,6±0,34 ^{ab}	305,5±20,78 ^a	130,4±9,35 ^{ab}	2,14±0,48	2,48±0,21	1,00±0,02	100
Og 2,06 g kg ⁻¹	19,8±0,67 ^{ab}	296,8±15,46 ^a	112,4±11,74 ^{ab}	2,24±0,05	2,86±0,29	0,99±0,01	100
p (Anova)	0,006	0,017	0,037	0,446	0,312	1	

Letras diferentes, por coluna, indicam diferença significativa entre os tratamentos (teste de Tukey; $p>0,05$). Lg = *Lippia grata*, Lo = *Lippia origanoides*, Og = *Ocimum gratissimum*, Comp. Final = comprimento final, TCE = taxa de crescimento específico, TCA = taxa de conversão alimentar.

Tabela 4. Valores médios dos parâmetros hematológicos de *Collossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleo essencial de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*.

Tratamentos	Ht (%)	Hb (g dL ⁻¹)	RBC (x 10 ⁶ µL ⁻¹)	VCM (fL ⁻¹)	HCM (pg)	CHCM (g dL ⁻¹)
Controle						
0 g kg ⁻¹	34,5±0,9	9,1±0,3	1,89±0,06 ^{ab}	185,6±7,8	48,92±2,2	26,6±1,1
Lg 0,86g kg ⁻¹	33,8±1,1	9,3±0,3	1,88±0,06 ^{ab}	183,9±8,7	49,79±2,2	27,3±0,7
Lg 1,72g kg ⁻¹	35,0±1,4	8,7±0,2	1,81±0,06 ^{ab}	195,4±8,4	48,76±1,8	25,3±0,8
Lo 0,76g kg ⁻¹	31,9±1,3	8,5±0,3	1,79±0,05 ^{ab}	178,7±6,7	48,11±2,3	27,0±0,9
Lo 1,52g kg ⁻¹	33,9±0,4	9,8±0,5	2,05±0,08 ^a	170,1±7,2	49,34±3,6	28,9±1,4
Og 1,03g kg ⁻¹	33,9±1,1	9,2±0,3	1,71±0,08 ^b	207,0±12,6	56,12±3,2	27,4±0,8
Og 2,06g kg ⁻¹	34,4±0,8	9,2±0,3	1,88±0,07 ^{ab}	187,2±8,6	49,48±1,5	26,8±0,7
P(Anova)	0,699	0,207	0,032	0,117	0,332	0,193

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Lg = *Lippia grata*, Lo = *Lippia origanoides*, Og = *Ocimum gratissimum*. Ht = hematócrito, Hb: hemoglobina, RBC = número de eritrócitos, VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 5. Frequência de ocorrência, por grau de danos, das alterações histopatológicas observados no fígado de *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*, após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleo essencial de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*.

Tipo de dano	Constituinte alvo do tecido hepático	Grau do dano	Frequência de Ocorrência relativa (%)
Hipertrofia celular/nuclear do hepatócito; vacuolização citoplasmática; deformação no contorno celular; dilatação dos vasos sinusoides	hepatócito; leito capilar no estroma hepático	I	57,12
Picnose/vacuolização nuclear; congestão vascular; rompimento celular	hepatócito; leito capilar no estroma hepático	II	40,62
Necrose focal	parênquima hepático	III	2,26
Soma			100

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos esforços dos vários grupos de pesquisa, os problemas sanitários que acometem o tabaqui *C. macrompomum* ainda representam um grande desafio. Dentre os entraves à produção, os surtos de infecção pelo endohelminto intestinal *Neochinorhynchus buttnerae* permanecem como fator limitante no ambiente de cultivo. Na busca por soluções, uma série de pesquisas com diferentes abordagens foram realizadas e que trouxeram importantes esclarecimentos a cerca da relação parasito-hospedeiro e que são fundamentais para subsidiar a busca por alternativas de controle desta doença.

Visando contribuir especificamente com as pesquisas contra a acantocefalose causada por *N. buttnerae* em tabaqui, na presente tese os seguintes resultados foram disponibilizados:

1) o estabelecimento de um protocolo para a manutenção dos helmintos adultos, em meio essencial mínimo de Eagle, suplementado com antibióticos e com troca do meio a cada dois dias, como forma de garantir a viabilidade de indivíduos de *N. buttnerae* para ensaios laboratoriais;

2) ampliamos as informações sobre os compostos químicos presentes em óleos essenciais a partir da prospecção de onze plantas medicinais cultivadas na Amazônia, revelamos a elevada eficácia *in vitro* dos mesmos e pudemos inferir, usando os óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, sobre as alterações estruturais no tegumento que inviabilizam a sobrevivência do *N. buttnerae*;

3) determinamos a eficácia *in vivo* dos OEs de *Lippia grata*, *Lippia origanoides* e *Ocimum gratissimum*, que foi de cerca de 60% e manutenção de 100% de sobrevivência dos peixes; este resultado, aliado aos bons resultados dos indicadores de saúde, morfológicos e fisiológicos, após 30 dias de fornecimento de ração contendo os óleos essenciais, permitiu concluir que os óleos essenciais de *L. grata*, *L. origanoides* e *O. gratissimum* são recomendados para estudos futuros em que outros protocolos possam ser testados, visando aperfeiçoar as estratégias de uso dos óleos essenciais, verificando o efeito dos seus compostos isolados ou combinados, os métodos de suplementação dos óleos essenciais na dieta e a manutenção de suas propriedades até o alcance dos acantocéfalos no órgão alvo e assim aumentar a eficácia anti-helmíntica.