

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

ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Aloysia*  
*triphylla*, *Lippia gracilis* E *Piper aduncum* NO CONTROLE DE  
*Piscinoodinium pillulare* EM *Colossoma macropomum*

PAULA RIBEIRO DOS SANTOS

MANAUS - AMAZONAS

OUTUBRO - 2021

PAULA RIBEIRO DOS SANTOS

ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS De *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* E *Piper aduncum* NO CONTROLE DE *Piscinoodinium pillulare* EM *Colossoma macropomum*

Orientadora: Dra. Edsandra Campos Chagas

Coorientadora: Dra. Profa. Sanny Maria de Andrade Porto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros – PPGCARP, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração: Produção Animal.

MANAUS - AMAZONAS

OUTUBRO - 2021

## Ficha Catalográfica

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

S237a Santos, Paula Ribeiro  
Atividade antiparasitária dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*,  
*Lippia gracilis* e *Piper aduncum* no controle de *Piscinoodinium*  
*pillulare* em *Colossoma macropomum* / Paula Ribeiro Santos . 2021  
72 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Edsandra Campos Chagas  
Coorientadora: Sanny Maria de Andrade Porto  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Recursos  
Pesqueiros) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Concentração letal. 2. Fisiologia. 3. Histopatologia. 4. Óleos  
essenciais. 5. *Colossoma macropomum*. I. Chagas, Edsandra  
Campos. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**PAULA RIBEIRO DOS SANTOS**

**Atividade antiparasitária dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* no controle de *Piscinoodinium pillulare* em *Colossoma macropomum***

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

Aprovado em 07 de outubro de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**



Dra. Edsandra Campos Chagas - Presidente  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA



Dra. Cristiane Meldau de Campos Amaral – Membro  
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS



Dra. Adriana Dantas - Membro  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Aos meus avós Bráz Ribeiro e Maria Ducarmo Ferreira (*In memoriam*) pelo  
eterno amor e incentivo.

**Dedico!**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Deus soberano, pela a minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho;

Aos meus queridos pais-avós, Braz Ribeiro e Maria Ducarmo Ferreira (*in memoriam*), por me proporcionarem o que há de mais precioso no mundo, a educação, sem eles eu não seria nada, juntamente com a minha mãe Maria Ribeiro, irmã Miriam Ribeiro, meus sobrinhos Livia e Heitor e aos demais familiares pelo acolhimento e incentivo, com todo carinho e amor, meu muito obrigada;

À Universidade Federal do Amazonas e à Embrapa Amazônia Ocidental por toda infraestrutura concedida e pela profissionalização, juntamente a toda equipe que me ajudaram em todas as etapas deste projeto;

À Capes pela concessão da bolsa de estudo e a FAPEAM pelo financiamento deste projeto;

À minha querida orientadora, Doutora Edsandra Campos Chagas por ter desempenhado tal função com tanta excelência, compartilhando conhecimentos e experiências e por sempre se fazer presente e prestativa do início ao fim deste projeto, principalmente pelas palavras de conforto incentivo e carinho nos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigada por ter sido uma profissional incrível e servir como exemplo para toda minha vida.

À minha querida coorientadora Profa. Doutora Sanny Maria de Andrade Porto, profissional que eu tanto admiro meu sincero agradecimento por todo apoio e orientação exercida com tanta perfeição, que me permitiram apresentar um melhor desempenho durante a execução deste trabalho, gratidão define;

Aos pesquisadores e doutores que contribuíram com suas críticas construtivas durante o exame de pré-qualificação, qualificação e defesa desta dissertação, Adriana Dantas, Cristiane Meldau; Christiane Patrícia de Oliveira, Patrícia Monteiro, Daniel Porto, Marcos Tavares-Dias e Fernando Marques;

Às coordenadoras do Programa de Pós-graduação, professoras Doutora Flávia Souza e Kedma Yamamoto pela constante busca de melhorias para o curso;

Aos professores e pesquisadores do corpo docente do PPGCARP/UFAM, Gabriela Jerônimo, Carlos Edwar Freitas, Jansen Zuanon, Vandick Batista e aos demais por compartilhar conhecimentos que contribuem para a qualificação que buscamos;

À Sra. Antônia da Costa secretária do curso, por sua disponibilidade e atenção;

Meus sinceros agradecimentos ao pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental Dr. Francisco Célio Chaves, a quem tanto admiro. Obrigada por todo apoio e responsabilidade no fornecimento dos óleos essenciais, pelos momentos de diversão e muitas risadas;

A professora Maria Inês Braga, por me auxiliar e orientar com tanto carinho e paciência em algumas etapas deste projeto e principalmente pela amizade, sou muito grata e tenho um imenso carinho;

Ao meu amigo Doutor Franmir Brandão, que esteve do início ao fim deste projeto me auxiliando e orientando nos experimentos e pela amizade;

Aos professores e pesquisadores, Marcelo Róseo, Fernanda Sebastião; Cláudia Majolo, Antônio José Inhamuns, Esner Magalhães e Roger Crescêncio pelo incentivo e apoio durante a execução do projeto;

Ao professor Doutor Gustavo Valadão por disponibilizar sua câmara de sedgewick rafter para a contagem dos parasitos, meu muito obrigada;

Agradeço imensamente a todos os profissionais da educação que passaram pela minha vida, mostrando de forma genuína o quanto é bonito ensinar e aprender. Minha admiração eterna por essa linda profissão;

A doutoranda Lorena Matos, pelo auxílio nas análises histopatológicas realizadas na UFAM, sou grata por toda companhia, paciência e amizade;

Ao programa de pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, local onde aprendi e conheci pessoas maravilhosas, Euclides Luis, Flávia Farias, Neyanna Anselmo, Luisa Sambora, Diego Valenti, Marcos Mereles, Alexandre Barai, Dimesson Andrade, Adriana Pontes (*in memoriam*) e aos demais, pelos os momentos de diversão e muitas risadas;

Aos amigos da Embrapa, Damy Caroline, Juliete Rocha, Marcondes Silva, Ana Maria Souza, Liliane Campos, Thamires Silva, Alexia Muniz, Johnny Velásquez, Caio Farias, Júlia Gomes, Marilson Gama e Lucas Barroso por toda ajuda durante as coletas e análises laboratoriais;

À todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram na realização desta etapa de minha vida.

**Muito obrigada!**

“Se a tua lei não fosse o meu prazer,  
o sofrimento já me teria destruído.  
Jamais me esquecerei dos teus  
preceitos, pois é por meio deles que  
preservas a minha vida”.

(Salmos 119:92-93)



## RESUMO

*Piscinoodinium pillulare* é um ectoparasito reconhecido mundialmente pelos surtos provocados em grande escala nas pisciculturas, e com registro em tambaqui, *Colossoma macropomum*, espécie nativa mais produzida no Brasil. A busca por produtos naturais como alternativa aos sintéticos para o tratamento de doenças em peixes tem crescido nos últimos anos, devido suas propriedades biodegradáveis e menor possibilidade de causar resistência parasitária. Diante deste cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antiparasitária dos óleos essenciais (OEs) de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* para o controle de *Piscinoodinium pillulare* em juvenis de tambaqui. Primeiramente foi avaliada a toxicidade aguda dos três OEs, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos: controle e cinco concentrações dos OEs (*A. triphylla* 60, 80, 100, 120 e 140 mg L<sup>-1</sup>, *L. gracilis* 35, 40, 45, 50 e 55 mg L<sup>-1</sup> e *P. aduncum* 42,5, 45, 47,5, 50 e 52,5 mg L<sup>-1</sup>), três repetições e tempo de exposição de 4 horas, visando a definição de concentrações seguras para aplicação em banhos terapêuticos, sendo estas concentrações baseadas na literatura, seguido de testes pilotos. Os resultados mostraram que a mortalidade e a severidade dos danos nas brânquias de tambaqui foram proporcionais ao aumento das concentrações dos OEs, com a concentração letal média (CL<sub>50-4 h</sub>) estimada em 109,57 mg L<sup>-1</sup> para *A. triphylla*, em 41,63 mg L<sup>-1</sup> para *L. gracilis* e em 48,17 mg L<sup>-1</sup> para *P. aduncum*. Os danos histopatológicos de grau II e de grau III foram de baixa frequência, e este último que inclui as alterações severas e irreversíveis foi registrado somente nas maiores concentrações do OE de *P. aduncum* (47,5, 50,0 e 52,5 mg L<sup>-1</sup>). Portanto, concentrações dos OEs abaixo da CL<sub>50-4 h</sub> podem ser utilizadas, em curtos períodos de exposição. Este protocolo foi adotado na segunda etapa deste estudo com o objetivo de determinar a eficácia dos três OEs no tratamento de *P. pillulare* em tambaqui após aplicação de três banhos terapêuticos de 15 minutos. Para isso, utilizou-se um DIC com sete tratamentos e três repetições: controle, OEs de *A. triphylla* (40 e 50 mg L<sup>-1</sup>), *L. gracilis* (20 e 30 mg L<sup>-1</sup>) e *P. aduncum* (10 e 20 mg L<sup>-1</sup>). Após os tratamentos com os óleos essenciais, a contagem do *P. pillulare* foi feita em câmara de sedimentação utilizando três alíquotas de cada amostra para a determinação dos índices parasitários de prevalência, abundância média e intensidade média, bem como a eficácia antiparasitária. Para avaliar o estado fisiológico dos peixes foram realizadas análises de hematócrito, número de eritrócitos, hemoglobina, glicose, proteínas totais, bem como a atividade das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. A eficácia dos OEs no controle de *P. pillulare* variou de 63,8 a 83,8%. Não houve diferença significativa entre tratamentos para os parâmetros hematológicos e bioquímicos, mas a infestação por *P. pillulare* promoveu redução no hematócrito e hemoglobina, além de aumento na glicose plasmática e

proteínas totais. Para os parâmetros enzimáticos, houve redução da alanina aminotransferase, mas não houve comprometimento da função hepática em tabaquis. Portanto, os OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* constituem boas alternativas terapêuticas para mitigar os impactos negativos causados pela infestação de *P. pillulare* na criação de tabaquis.

**Palavras-chave:** concentração letal, fisiologia, histopatologia, óleos essenciais, *Colossoma macropomum*.

## ABSTRACT

*Piscinoodinium pillulare* is an ectoparasite recognized worldwide by large-scale outbreaks in fish farms, and registered in tambaqui, *Colossoma macropomum*, the most produced native fish species in Brazil. The search for natural products as an alternative to synthetic ones for the treatment of fish diseases has grown in recent years, due to their biodegradable properties and less possibility of causing parasite resistance. Given this scenario, the aim of this study was to evaluate the antiparasitic activity of essential oils (EOs) from *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* and *Piper aduncum* for the control of *P. pillulare* in juvenile tambaqui. Firstly, the acute toxicity of the three EOs was evaluated in a completely randomized design (DIC), with six treatments: the control and five concentrations of EOs (*A. triphylla* 60, 80, 100, 120 and 140 mg L<sup>-1</sup>, *L. gracilis* 35, 40, 45, 50 and 55 mg L<sup>-1</sup> and *P. aduncum* 42.5, 45, 47.5, 50 and 52.5 mg L<sup>-1</sup>), with three replicates and a 4-hour exposure. This procedure aimed to define safe concentrations for application in therapeutic baths, which were also based on literature data, followed by pilot tests. The results showed that the mortality and severity of damage to the tambaqui gills were proportional to the increase in the concentrations of the EOs, with the mean lethal concentration (LC<sub>50-4 h</sub>) estimated at 109.57 mg L<sup>-1</sup> for *A. triphylla*, at 41.63 mg L<sup>-1</sup> for *L. gracilis* and at 48.17 mg L<sup>-1</sup> for *P. aduncum*. Grade II and grade III histopathological damage were of low frequency, and the latter, which includes severe and irreversible alterations, was recorded only in the highest concentrations of *P. aduncum* EO (47.5, 50.0 and 52.5 mg L<sup>-1</sup>). Therefore, EO concentrations below the LC<sub>50-4 h</sub> can be used for short exposure periods. This protocol was adopted in the second phase of this study in order to determine the effectiveness of the three EOs in the treatment of *P. pillulare* in tambaqui after application of three therapeutic baths of 15 minutes. For this, a DIC with seven treatments and three replications was used: control, EOs of *A. triphylla* (40 and 50 mg L<sup>-1</sup>), *L. gracilis* (20 and 30 mg L<sup>-1</sup>) and *P. aduncum* (10 and 20 mg L<sup>-1</sup>). After treatments with essential oils, *P. pillulare* was quantified in a sedgewick rafter câmara using three aliquots of each sample to determine the parasitic indices of prevalence, mean abundance and mean intensity, as well as the antiparasitic efficacy. To assess the physiological state of fish, analyzes of hematocrit, erythrocyte counting, hemoglobin, glucose, total proteins, and the activity of the enzymes aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase were determined. The effectiveness of EOs in controlling *P. pillulare* ranged from 63.8 to 83.8%. There was no significant difference between treatments for hematological and biochemical parameters, but the infestation by *P. pillulare* promoted a reduction in hematocrit and hemoglobin, in addition to an increase in plasma glucose and total proteins. For enzymatic parameters, there was a reduction in alanine aminotransferase, but there was no

impairment of liver function in tambaqui. Therefore, the EOs of *A. triphylla*, *L. gracilis* and *P. aduncum* are good therapeutic alternatives to mitigate the negative impacts caused by the infestation of *P. pillulare* in the tambaqui rearing.

**Keywords:** lethal concentration, physiology, histopathology, essential oils, fish, *Colossoma macropomum*.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Representação da composição química dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* (A), *Lippia gracilis* (B) e *Piper aduncum* (C).....41

**Figura 2.** Taxa de mortalidade (%) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* submetidos a diferentes concentrações dos óleos essenciais de *A. triphylla* (A), *L. gracilis* (B) e *P. aduncum* (C) durante 4 horas, e estimativas da concentração necessária de óleo para que a mortalidade atinja 50% (CL<sub>50</sub>).....42

**Figura 3.** Identificação dos danos histopatológicos observados nas brânquias de *Colossoma macropomum*, após 4 horas de exposição aos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum*. A: Descolamento epitelial (asteriscos) na concentração de 40 mg L<sup>-1</sup> do óleo essencial de *L. gracilis*. B: Dilatação capilar nas lamelas branquiais dos peixes expostos a 50 mg L<sup>-1</sup> do óleo essencial de *P. aduncum* (seta). C: Fusão lamelar observada na concentração de 35 mg L<sup>-1</sup> do óleo essencial de *L. gracilis* (seta grossa). D: Necrose observada nas brânquias dos peixes expostos a 50 mg L<sup>-1</sup> do óleo essencial de *P. aduncum*, com áreas de degeneração citoplasmática (asteriscos).....43

**Figura 4.** Valores médios do índice de alteração histopatológica (IAH) nas brânquias de *Colossoma macropomum* expostos aos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* (A), *Lippia gracilis* (B) e *Piper aduncum* (C). Letras diferentes sobre a barra indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Dunn (p<0,05).....46

### CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Eficácia antiprotozoária dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* no controle de *Piscinoodinium pillulare* em tambaqui (*Colossoma macropomum*). Tratamentos: AT 40 e AT 50 – *A. triphylla* 40 e 50 mg L<sup>-1</sup>, LG 20 e LG 30 - *L. gracilis* 20 e 30 mg L<sup>-1</sup>, PA 10 e PA 20 - *P. aduncum* 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>.....65

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Frequência relativa (%) dos danos histopatológicos em brânquias de *Colossoma macropomum*, após exposição aos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum*.....44

**Tabela 2.** Frequência relativa (%) por escala do índice de alteração histopatológica (IAH) observado em brânquias de *Colossoma macropomum*, após exposição aos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum*.....46

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Principais compostos majoritários dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* (A), *Lippia gracilis* (B) e *Piper aduncum* (C).....63

**Tabela 2.** Índices parasitários de prevalência, intensidade média e abundância média de *Piscinoodinium pillulare* nas brânquias de tambaqui (*Colossoma macropomum*), após banhos terapêuticos com os óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum*.....64

**Tabela 3.** Valores médios dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e enzimáticos de *Colossoma macropomum* infestado por *Piscinoodinium pillulare*, após banhos terapêuticos com óleo essencial de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum*.....66

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	16
<b>2. HIPÓTESES</b> .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
3.1. Objetivo Geral .....	21
3.1.1. Objetivos Específicos .....	21
<b>Capítulo 1</b> .....	22
<b>1. Introdução</b> .....	24
<b>2. Material métodos</b> .....	25
2.1. Extração e caracterização química dos óleos essenciais .....	25
2.2. Aquisição e aclimatação dos peixes .....	26
2.3. Avaliação da toxicidade aguda dos óleos essenciais .....	26
2.4. Análises histopatológicas .....	27
2.5. Análise estatística .....	27
<b>3. Resultados</b> .....	28
<b>4. Discussão</b> .....	30
<b>5. Conclusão</b> .....	33
<b>Agradecimentos</b> .....	33
<b>Referências</b> .....	33
<b>Capítulo 2</b> .....	45
<b>1. Introdução</b> .....	47
<b>2. Material métodos</b> .....	48
2.1. Extração e caracterização química dos óleos essenciais .....	48
2.2. Aquisição, aclimatação e análise parasitária dos peixes.....	49
2.3. Desenho experimental .....	49
2.4. Variáveis hematológicas, bioquímicas e enzimáticas.....	50
2.5. Análise parasitológica e eficácia dos óleos essenciais .....	50
2.6. Análise estatística .....	50
<b>3. Resultados</b> .....	51
<b>4. Discussão</b> .....	51
<b>5. Conclusão</b> .....	55
<b>Agradecimentos</b> .....	55
<b>Referências</b> .....	55
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	67

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento populacional no mundo vem impulsionando a busca por alimentos mais saudáveis (FAO, 2020), o que tem refletido diretamente na aquicultura, setor de produção animal que mais cresce no mundo (Brabo et al., 2016). Neste cenário, estima-se que foram produzidos mundialmente cerca 82,1 milhões de toneladas de pescado em 2018, com acréscimo de 3,2% comparado ao ano anterior, garantindo uma receita de US\$ 250 bilhões de dólares (Cyrino et al., 2020; FAO, 2020).

No Brasil a produção da aquicultura continental atingiu a marca de 802.930 toneladas, com um aumento de 5,93% em 2020. A produção de espécies nativas se mantém como um importante segmento na piscicultura brasileira, apesar de sua participação reduzida. A produção de 278.671 toneladas em 2020 foi 3,2% menor do que o ano anterior. Em 2018, houve um recuo de 4,7% na produção, e em 2019 o aumento não foi expressivo, sendo de apenas 20 toneladas. Com este cenário, a participação dos peixes nativos na produção nacional caiu para 34,7% (PEIXE BR, 2021).

A produção das espécies nativas é representada principalmente pelo tambaqui, *Colossoma macropomum*, que participou com 19% da produção total em 2019, cerca de 101.079 toneladas (Valenti et al., 2021). Trata-se do segundo maior peixe de escamas da América do Sul, podendo alcançar mais de um metro de comprimento e atingir 30 kg, além de alcançar a maturidade sexual entre o 4º e 5º ano de vida. É uma espécie onívora e esta plasticidade é uma adaptação a sazonalidade de oferta de alimentos na bacia amazônica, onde esses animais se alimentam principalmente de frutos e sementes no período chuvoso e de zooplâncton no período de seca (Araújo-Goulding, 1998; Saint-Paul, 2017). Em sistemas de cultivo a produção pode chegar a 18 toneladas por hectare e 2,5 kg em dez meses de cultivo com o uso de aeradores (Izel et al., 2013).

Com o crescimento da produção de tambaqui e da intensificação dos sistemas produtivos, observou-se também aumento na ocorrência de doenças parasitárias, com representantes dos grupos dos protozoários, mixosporídeos, monogenoídeos, nematóides, acantocéfalos e crustáceos (Maciel et al., 2011; Godoi et al., 2012; Tavares-Dias et al., 2014; 2015; Maciel et al., 2018; Pereira; Morey, 2018; Fujimoto et al., 2019; Chagas et al., 2019; Sousa et al., 2020). Com destaque para o grupo dos protozoários, os registros em tambaqui são de *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876), *Piscinoodinium pilulare* (Shaperclaus, 1954), *Trichodina* sp. (Claus, 1874), *Chilodonella* sp. (Strand, 1926), *Tetrahymena* sp. (Furgason, 1940), *Apiosoma* sp. (Blanchard, 1885) e *Trypanosoma* sp. (Gruby, 1843) (Martins et al., 2000; Tavares-Dias et al., 2006; Santos et al., 2013; Jerônimo et al., 2015; Ferreira Junior et al., 2018;



Rodrigues et al., 2018; Arbildo-Ortiz et al., 2020). Dentre estes parasitos, o dinoflagelado *P. pillulare* tem ocasionado prejuízos econômicos consideráveis na aquicultura (Tavares-Dias; Martins, 2017).

O dinoflagelado *P. pillulare* possui ciclo de vida direto e tem como características o formato de saco ou pêra, cor castanho-amarelada, presença de cloroplasto dentre as suas organelas e um disco de fixação composto de rizocistos que penetram nas células dos hospedeiros, sendo sua característica parasitária decorrente de sua ação oportunista na fixação e destruição dos tegumentos e brânquias dos peixes. A patogenia provocada por este parasito promove aumento da produção de muco, hemorragias no tegumento, degeneração e necrose das células, inflamação, além de hiperplasia e fusão das lamelas secundárias, levando a um quadro grave de problemas respiratórios (Martins et al., 2001; Marchiori; Martins, 2013; Martins et al., 2015). É um parasito reconhecido mundialmente pelos surtos provocados em grande escala nas pisciculturas comerciais de peixes continentais (Shaharom-Harrison et al., 1990; Martins et al., 2001; Sant'ana et al., 2012; Shinn et al., 2015).

Recentemente, altas infestações por *Piscinoodinium pillulare* ocorreram na região de Maynas, Loreto, na Amazônia peruana em criação semi-intensiva de juvenis de tambaquis. De 5.000 peixes presentes no plantel, 1.500 morreram, representando cerca de 30% do total, sendo este o primeiro relato de ocorrência do parasito em tambaquis cultivados nesta região (Arbildo-Ortiz et al., 2020). Na Venezuela, estudos epidemiológicos detectaram prevalência de 100% do parasito em tanques de engorda de tambaqui no Estado Cojedes, Venezuela (Dezon De Fogel et al., 2004). No Brasil, estudos epidemiológicos realizados na região Nordeste do Estado de São Paulo, com duração de dois anos, identificaram 23.000 peixes mortos infectados por *P. pillulare*, destes 40% (9.200 peixes) foi representado pelo tambaqui (Martins et al., 2001). No Distrito Federal há registro de surtos por *P. pillulare*, associado a *Trichodina* sp. em tambaquis (Ferreira-Junior et al., 2018).

No estado do Amazonas foram observadas altas infestações por *P. pillulare* em tambaqui cultivado em pisciculturas comerciais. De 90 peixes coletados em cinco pisciculturas 73,3% estavam parasitados, sendo 9 peixes (14%) no tegumento, 21 peixes (32%) exclusivamente nas brânquias e 36 peixes (55%) nas brânquias e tegumento (Amorim-Neto, 2015). Gomes et al. (2018) detectaram surtos *P. pillulare* na criação de tambaqui e matrinxã (*Brycon amazonicus*), com os peixes apresentando os sinais clínicos da doença e alta mortalidade, e em acréscimo validaram um protocolo de diagnóstico rápido da doença. No estado do Amapá foi registrado uma alta prevalência (96,7%) de *P. pillulare* nas brânquias de tambaqui cultivado em tanque-rede (Santos et al., 2013).

Para o tratamento dos ectoparasitos em peixes são utilizados produtos químicos como o sulfato de cobre, permanganato de potássio, verde malaquita, formalina, entre outros (Pavanelli et al., 2008; Carneiro et al., 2005; Andrade-Porto et al., 2017; Nebbia et al., 2017; Tavares-Dias, 2021a,b). Sabe-se que o uso dessas substâncias na aquicultura é restrito e pode causar resistência à patógenos, imunossupressão, poluição ambiental e acúmulo de resíduos químicos, que podem ser potencialmente perigosos para a saúde pública, ou ainda apresentar baixa aplicabilidade (Carneiro et al., 2005; Chiara-Bulfon et al., 2015; Tavares-Dias, 2021a,b). Estas restrições têm estimulado cada vez mais a busca por moléculas ativas de origem vegetal, como os óleos essenciais, tornando-se hoje um foco de pesquisa e desenvolvimento, especialmente em função da comprovação de suas atividades antiestresse, antibacteriana, antihelmíntica e antiprotozoária em peixes, decorrentes de seus princípios ativos alcalóides, flavonóides, pigmentos, compostos fenólicos, terpenoides e esteroides (Reverter et al., 2014; Tavares-Dias, 2018; Zhu, 2020; Dawood et al., 2021).

De acordo com o potencial bioativo dos constituintes dos óleos essenciais, eles são utilizados como anestésicos em operações de rotina na aquicultura e como sedativos na água de transporte dos peixes, com o objetivo de reduzir as respostas de estresse e a mortalidade dos animais, além de manter as características sensoriais do filé dos peixes (Azambuja et al., 2011; Aydin; Barbas, 2020). Os óleos essenciais podem melhorar as respostas inata e adaptativa do sistema imunológico, facilitando principalmente a função das células fagocíticas, atividade da lisozima e respostas de anticorpos, que conferem melhor proteção contra doenças infecciosas (Brum et al., 2017; Peterfalvi et al., 2019). Em função do grande potencial com o uso de plantas medicinais na aquicultura, há necessidade de priorizar tais estudos para o controle das doenças parasitárias ocasionadas pelo dinoflagelado *P. pillulare* em tambaquis, com plantas da biodiversidade brasileira ou aclimatadas, que já apresentam bons resultados para o tambaqui ou outras espécies de peixes no que diz respeito a atividade antiparasitária, seja para helmintos ou protozoários (Tavares-Dias, 2018).

O tratamento de protozoários com óleos essenciais e extratos vegetais, incluindo seus compostos isolados, em sua grande maioria são realizados na forma de banhos terapêuticos, de curta e longa duração (Soares et al., 2017; Nízio et al., 2017; Ferreira et al., 2019; Monteiro et al., 2021). Entretanto, várias etapas são necessárias na escolha de óleo essencial para os estudos patológicos e a toxicidade em particular é primordial, pois assim como qualquer outro fármaco os óleos essenciais podem ter efeitos adversos se administrados em alta concentração, podendo afetar o desenvolvimento dos peixes e causar a mortes destes (Tavares-Dias, 2018; Dawood et al., 2021). Neste sentido, os testes de toxicidade aguda são conduzidos para determinação da

concentração letal média (CL<sub>50</sub>), que é definida como a concentração que causa mortalidade de 50% dos organismos, durante o período de exposição de até 96 horas, sendo também avaliados os efeitos secundários da exposição à substância natural por meio de análises fisiológicas e histopatológicas (Tavares-Dias, 2018). Essas informações são imprescindíveis para definição de concentrações seguras para emprego nos testes de eficácia de qualquer fármaco ou produto natural.

Dentre as plantas medicinais que produzem óleo essencial com potencial para o uso na aquicultura destacam-se as espécies *Aloysia triphylla* (cedrina), *Lippia gracilis* (alecrim-de-tabuleiro) e *Piper aduncum* (pimenta-de-macaco) (Zeppenfeld et al., 2014; Corral et al., 2018; Bandeira-Junior et al., 2018; Barriga et al., 2020), que são plantas nativas da América do Sul e possuem ampla distribuição em regiões de clima tropical (Lorenzi; Matos, 2008). Estas plantas se destacam por serem cultivadas comercialmente no Brasil, pela produção satisfatória de biomassa, teor de óleo essencial, por não apresentarem problemas relacionadas a propagação, época de corte, adubação, dentre outros (Salimena, 2002; Brant et al., 2008; Lorenzi; Matos, 2008).

O óleo essencial de *A. triphylla* foi avaliado como anestésico, aditivo alimentar, antioxidante e antibacteriano para peixes (Zeppenfeld et al., 2017; Bandeira Junior et al., 2018; Brandão et al., 2021). Com atividade anti-helmíntica destaca-se o óleo essencial de *L. gracilis*, com bons resultados no controle *in vitro* do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* e eficácia *in vitro* e *in vivo* para monogenea (*Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium boegeri* e *Linguadactyloides brinkmanni*) em tambaquis (Barriga et al., 2020; Oliveira et al., 2021). Para *P. aduncum* foi obtida eficácia *in vivo* de 76,1% (64 mL kg<sup>-1</sup>) no controle do nematoide *Hysterothylacium* sp. em pirarucu (*Arapaima gigas*), sem afetar sua homeostase orgânica (Corral et al., 2018). Entretanto, não há estudos avaliando estes óleos essenciais quanto à sua toxicidade e eficácia antiparasitária frente o protozoário *P. pillulare* em tambaquis, nem informações sobre os efeitos secundários que os mesmos podem causar no organismo, e essa lacuna do conhecimento precisa ser elucidada dado o aumento de registros de mortalidade na produção em decorrência de *P. pillulare*, o que permitirá contribuir com tratamentos alternativos naturais para promoção da aquicultura sustentável.

## 2. HIPÓTESES

- ❖ Os óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* não apresentam toxicidade para juvenis de tambaquis.
- ❖ Exposição aos óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* por curto período (4 horas) não causam alterações histopatológicas graves nas brânquias de tambaquis.
- ❖ Os óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* apresentam atividade antiparasitária sobre o dinoflagelado *Piscinoodinium pillulare* de tambaquis.
- ❖ Concentrações dos óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* eficazes no controle de *P. pillulare* não promovem alterações nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e enzimáticos de tambaqui.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiparasitária dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* para o controle de *Piscinoodinium pillulare* em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

##### 3.1.1. Objetivos Específicos

- Extrair os óleos essenciais das espécies *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum*, e determinar sua composição química;
- Determinar a concentração letal média ( $CL_{50} - 4$  h) dos óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* em juvenis de tambaqui;
- Avaliar as alterações histológicas nas brânquias de tambaqui, expostos aos óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum*;
- Determinar a eficácia de banhos terapêuticos com óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* no controle de *P. pillulare* em tambaqui;
- Avaliar as possíveis alterações nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e enzimáticos, após aplicação de banhos com os óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* em tambaquis parasitados por *P. pillulare*.

## Capítulo 1

### **Toxicidade aguda dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* em *Collossoma macropomum***

Artigo elaborado conforme as normas da Aquaculture

**Toxicidade aguda dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* em *Colossoma macropomum***

Paula Ribeiro dos Santos<sup>a</sup>; Sanny Maria de Andrade Porto<sup>b</sup>; Maria Inês Braga de Oliveira<sup>c</sup>, Franmir Rodrigues Brandão<sup>a</sup>; Francisco Célio Maia Chaves<sup>d</sup>; Lorena Vieira de Matos<sup>e</sup>; Johnny Gustavo Rocha Velásquez<sup>f</sup>; Edsandra Campos Chagas<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros - PPGCARP, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

<sup>b</sup>Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos, Departamento de Ciências Pesqueiras, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

<sup>d</sup>Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil

<sup>e</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia de Água doce e Pesca Interior – BADPI, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, AM, Brasil

<sup>f</sup>Engenheiro Ambiental - Faculdade Metropolitana de Manaus (FAMETRO), Manaus, AM, Brasil

<sup>g</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Lábrea, AM, Brasil

**Resumo**

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade aguda dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), e avaliar as possíveis alterações histopatológicas em suas brânquias. Para os testes de toxicidade aguda, juvenis de tambaqui (n=24/tratamento) foram distribuídos em 6 tratamentos, com três repetições, sendo o controle e cinco concentrações do OE de *A. triphylla* (60, 80, 100, 120 e 140 mg L<sup>-1</sup>), *L. gracilis* (35, 40, 45, 50 e 55 mg L<sup>-1</sup>) e *P. aduncum* (42,5, 45, 47,5, 50 e 52,5 mg L<sup>-1</sup>), com exposição de 4 horas. A taxa de mortalidade e a severidade dos danos nas brânquias de tambaqui foram proporcionais ao aumento da concentração do OE, com os valores de CL<sub>50-4h</sub> estimados em 109,57 mg L<sup>-1</sup> para *A. triphylla*, em 41,63 mg L<sup>-1</sup> para *L. gracilis* e em 48,17 mg L<sup>-1</sup> para *P. aduncum*. Os principais danos morfológicos observados nas brânquias de tambaqui, expostos aos três OEs, foram os de grau I: hipertrofia e hiperplasia das células do epitélio lamelar, fusão lamelar, descolamento epitelial, dilatação e constrição capilar, proliferação de células de cloreto e de células mucosas e edema, em baixa frequência os de grau II como ruptura epitelial e aneurisma lamelar. Necrose, dano de grau III, foi observado somente nas lamelas

branquiais expostas ao OE de *P. aduncum* (47,5, 50,0 e 52,5 mg L<sup>-1</sup>). Concentrações do OE abaixo dos valores de CL<sub>50-4 h</sub> podem ser utilizados com parcimônia, em curtos períodos de exposição, para o tratamento de doenças na criação de tambaqui.

**Palavras-chave:** concentração letal, histologia, produtos naturais, *Collossoma macropomum*.

## 1. Introdução

A aquicultura destaca-se como o setor de produção animal que mais cresce no mundo, sendo impulsionada pelo crescimento populacional e a demanda por alimentos saudáveis (Valenti et al., 2021). Neste cenário a aquicultura mundial produziu 82,1 milhões de toneladas, e deste total 51,3 milhões foi proveniente da aquicultura de água doce, enquanto que 30,8 milhões de toneladas foram de criação em ambientes marinhos (FAO, 2020). Com destaque para a produção de peixes no Brasil, no ano de 2020 foram produzidas 802.930 toneladas, registrando um crescimento de 5,93% em relação ao ano anterior.

Dentre os peixes nativos, o tambaqui (*Collossoma macropomum*) é a principal espécie produzida no Brasil (Valenti et al., 2021). Entretanto, a produção de peixes nativos diminuiu 3,2% em relação a 2019, devido ao atraso nos investimentos, dificuldades logísticas, entre outras (PEIXE BR, 2021). Somando-se a isso há ainda a presença de outros obstáculos como a produção de peixes de tamanho heterogêneo, a susceptibilidade a contaminação por *Salmonella* e a presença de diversos grupos de parasitos (Valenti et al., 2021).

Com relação a ocorrência de doenças parasitárias, as perdas de peixes podem chegar até 20% na produção com prejuízos econômicos estimados em cerca de US\$ 1,05 a US\$ 9,58 bilhões/ano (Shinn et al., 2015). Além das altas taxas de mortalidades no ambiente de cultivo, há ainda o comprometimento no desempenho reprodutivo, impacto negativo na conversão alimentar, afetando o desempenho geral dos peixes (Tavares-Dias & Martins, 2017). Na criação de tambaqui, os parasitos com maior ocorrência pertencem aos grupos dos mixosporídeos, crustáceos, monogenea, nematoides, acantocéfalos e protozoários (Maciel et al., 2018; Pereira & Morey, 2018; Santos et al., 2018; Chagas et al., 2019; Fujimoto et al., 2019; Sousa et al., 2020).

Produtos químicos como sulfato de cobre, formalina, permanganato de potássio, praziquantel e cloreto de sódio são utilizados no tratamento contra diferentes parasitos, porém podem apresentar risco aos consumidores, peixes e meio ambiente ou baixa aplicabilidade quando utilizado em escala comercial (Campos et al., 2014; Andrade-Porto et al., 2017; Dewi et al., 2018; Farias et al., 2021; Tavares-Dias, 2021a,b). Além disso, esses produtos são restritos pela legislação brasileira para o uso na aquicultura, o que reforça a busca por substâncias



bioativas como é o caso dos óleos essenciais (OEs), em função de sua atividade biológica contra os principais patógenos que afetam a aquicultura, especialmente como antiparasitários de peixes nativos brasileiros (Baldissera et al., 2017; Cunha et al., 2017; Soares et al., 2017a; Corral et al., 2018; Ferreira et al., 2019; Costa et al., 2020). Diferente dos fármacos, os óleos essenciais são mais facilmente biodegradáveis, com menor tempo de permanência na água e menor probabilidade de causar resistência dos patógenos (Reverter et al., 2014; Tavares-Dias, 2018; Zhu, 2020).

Neste sentido, o óleo essencial de três espécies de plantas pertencentes às famílias Verbenaceae (*Aloysia triphylla* e *Lippia gracilis*) e Piperaceae (*Piper aduncum*) foram selecionadas para avaliação de sua atividade antiparasitária no controle de parasitos do tambaqui, em razão de suas propriedades anti-protozoária, anti-helminítica, inseticida, fungicida, bactericida, acaricida, larvicida e moluscida, com eficácia comprovada tanto em patologias de humanos (Lucena et al., 2017), quanto de animais, incluindo os peixes (Corral et al., 2018; Tavares-Dias, 2018; Barriga et al., 2020; Oliveira et al., 2021). Contudo, para o uso dos óleos essenciais como antiparasitários é imprescindível avaliar a toxicidade destes para os peixes, analisando as alterações comportamentais e histopatológicas dos órgãos após o período de exposição, determinando assim concentrações seguras a serem aplicadas na terapia contra os patógenos, sem afetar a espécie não alvo (Tavares-Dias, 2018; Miura et al., 2021).

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade aguda dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*), e avaliar as possíveis alterações histopatológicas em suas brânquias.

## **2. Material métodos**

### *2.1.Extração e caracterização química dos óleos essenciais*

Espécimes de plantas de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* foram cultivadas na divisão de plantas medicinais e hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brasil. Folhas e inflorescências foram coletadas e secas em temperatura ambiente, e após secagem os óleos essenciais destes materiais foram extraídos pelo método de hidrodestilação, em aparelho de Clevenger, por cerca de duas horas. Ao final da extração, amostras do óleo essencial foram recolhidas e analisadas quanto a sua composição química por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, conforme descrito em Oliveira et al. (2021).

## 2.2. Aquisição e aclimação dos peixes

Juvenis de tambaqui ( $103,2 \pm 36,9$  g;  $16,6 \pm 2,8$  cm) foram adquiridos em piscicultura da fazenda experimental da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, AM), onde foram aclimatados por sete dias em tanques circulares de fibra de 1000 L, com sistema de circulação de água, aquecimento e aeração constante. Durante esse período os peixes foram alimentados com ração extrusada comercial para peixes onívoros, contendo 32% de proteína bruta, até a saciedade aparente, duas vezes ao dia.

Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados durante o decorrer de todo o experimento, com o uso de aparelhos digitais, como oxímetro (YSI Pro20, YSI Inc., USA) e pHmetro (YSI F-1100, YSI Inc., USA). A alcalinidade e dureza foram determinadas pelo método de titulação e a amônia total pelo método de endofenol (APHA,1992). Os valores médios dos parâmetros de qualidade de água foram: oxigênio  $5,03 \pm 0,4$  mg L<sup>-1</sup>; temperatura  $29,9 \pm 1,9$  °C; pH  $6,6 \pm 0,3$ ; alcalinidade  $95,16 \pm 39,86$  mg L<sup>-1</sup>; dureza  $10,8 \pm 1,46$  mg L<sup>-1</sup> e amônia  $0,28 \pm 0,016$  mg L<sup>-1</sup>.

Este estudo foi desenvolvido com a aprovação de seu protocolo pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental (protocolo nº 02/2019).

## 2.3. Avaliação da toxicidade aguda dos óleos essenciais

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados em tanques circulares com capacidade de 70 litros, em sistema estático com aeração constante da água e manutenção da temperatura em  $29,9 \pm 1,9$  °C. Os peixes foram aclimatados nestas unidades experimentais (n=8/tanque) por sete dias. As concentrações dos OEs foram determinadas com base em dados já publicados na literatura, e seguido de testes preliminares, onde foram estabelecidas a menor concentração capaz de promover 100% de mortalidade e a maior concentração que não causa a mortalidade dos peixes. Os testes definitivos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e três repetições, sendo o controle (somente água do tanque) e cinco concentrações dos OEs de *Aloysia triphylla* (60, 80, 100, 120 e 140 mg L<sup>-1</sup>), *Lippia gracilis* (35, 40, 45, 50 e 55 mg L<sup>-1</sup>) e *Piper aduncum* (42,5, 45, 47,5, 50 e 52,5 mg L<sup>-1</sup>). O óleo essencial foi diluído em álcool etílico, na proporção de 1:10. O tempo de exposição aos óleos essenciais foi estipulado em 4 horas, conforme recomendações de Malheiros et al. (2016), por oferecer boa margem de segurança para banhos terapêuticos de curta duração.

Nos ensaios definitivos, após quatro horas de exposição às diferentes concentrações dos óleos essenciais, a taxa de mortalidade e o comportamento dos peixes foram registrados.

Com relação ao comportamento dos peixes durante os ensaios foram observados os seguintes parâmetros: perda de equilíbrio, alterações no movimento operculares e natação irregular. Os peixes foram considerados mortos quando apresentaram parada nos batimentos operculares, da nadadeira caudal e por não responderem mais aos estímulos mecânicos vindos do ambiente externo, assim como relatado no trabalho de Ferreira et al. (2019). Com os dados de mortalidade foram calculados os valores de concentração letal média ( $CL_{50-4\text{ h}}$ ) para cada óleo essencial, utilizando o método estatístico de Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al., 1977), e a partir destas informações os OEs foram classificados quanto à sua toxicidade para o tambaqui, com base nos critérios de Zucker (1985), que estabelece que compostos com valores de  $CL_{50} < 0,1\text{ mg L}^{-1}$  são considerados altamente muito tóxicos, entre  $0,1$  e  $1,0\text{ mg L}^{-1}$  são altamente tóxicos, no intervalo  $< 1,0$  e  $\leq 10\text{ mg L}^{-1}$  são moderadamente tóxicos, entre  $> 10$  e  $\leq 100\text{ mg L}^{-1}$  são ligeiramente tóxicos e  $> 100\text{ mg L}^{-1}$  são praticamente não tóxicos.

#### 2.4. Análises histopatológicas

Após o ensaio de toxicidade, brânquias de seis peixes de cada tratamento com OE de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* foram coletadas, após eutanásia, para as análises histopatológicas. As amostras coletadas, 12 por tratamento, foram fixadas em formalina tamponada a 5% por 24 horas, na sequência desidratados em uma série ascendente de etanol (70, 80, 90 e 100%), diafanizados em xilol, impregnados em parafina líquida a 60 °C. Na sequência, as amostras foram emblocadas em parafina para a microtomia, conforme Prophet et al. (1992). As secções de 5  $\mu\text{m}$  de espessura (duas de cada amostra) foram coradas com hematoxilina-eosina (Bancroft & Gamble, 2002). As lamelas secundárias foram observadas em microscópio óptico (Leica, DM 500), acoplado ao sistema de captura de imagens. Essas imagens foram utilizadas para análise semiquantitativa dos danos branquiais e classificação em: danos de estágio I (órgão não comprometido), danos de estágio II (danos moderados que comprometem a função normal dos órgãos) e danos de estágio III (danos muito graves e irreversíveis). Em seguida, o valor do índice de alteração histológica (IAH) para cada amostra foi calculado, utilizando a fórmula  $IAH = 10^0 \Sigma I + 10^1 \Sigma II + 10^2 \Sigma III$ , onde I, II e III são os estágios de classificação das alterações teciduais. Os valores obtidos foram interpretados de acordo com Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994).

#### 2.5. Análise estatística

O modelo de regressão logística foi utilizado para determinação da  $CL_{50-4\text{ h}}$  dos óleos essenciais, bem como apresentação da equação e a curva de mortalidade. Os valores do índice

de alteração histológica não atenderam os pressupostos de normalidade de Shapiro wilk e de homoscedasticidade de Levene, assim foi aplicado a estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparar os índices de alterações histopatológicas entre os tratamentos. O nível de significância utilizado em todos os testes foi de 95% ( $p$ -value  $\geq 0,05$ ), sendo utilizado o Software R, versão 4.0.2.

### 3. Resultados

Os principais compostos encontrados nos OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* são apresentados na Figura 1. Estes OEs têm como compostos majoritários o  $\beta$ -pineno (22,1%), *trans*-pinocanfona (13,1%) e acetato de *trans*-pinocarvila (7,6%) para *A. triphylla*, carvacrol (42,2%), *p*-cimeno (11,2%) e  $\gamma$ -terpineno (10,7%) para *L. gracilis*, dilapiol (80,7%), (*E*)-cariofileno (4,6%) e miristicina (2,9%) para *P. aduncum* (Figura 1).

Nos ensaios de toxicidade não houve registro de mortalidades de peixes no grupo controle durante o período do experimento, que foi de 4 h. Para a *A. triphylla* as mortalidades foram crescentes a partir da concentração de 80 mg L<sup>-1</sup>, após 200 minutos de exposição, representando 12,5% de mortalidade e 100% na maior concentração (140 mg L<sup>-1</sup>), com início das mortalidades após 25 minutos da aplicação do OE (Figura 2A). Para *L. gracilis* as mortalidades ocorreram na menor concentração (35 mg L<sup>-1</sup>), a partir de 120 minutos de exposição ao OE, representando uma taxa de 29,17% do total de indivíduos. Na maior concentração de *L. gracilis* (55 mg L<sup>-1</sup>) os peixes começaram a morrer a partir de 30 minutos de exposição, alcançando uma taxa de 100% com 240 minutos, sendo este o tempo máximo estabelecido (Figura 2B). De forma semelhante para *P. aduncum*, as mortalidades dos peixes iniciaram na menor concentração (42,5 mg L<sup>-1</sup>) com 40 minutos de exposição. Na maior concentração de *P. aduncum* (52,5 mg L<sup>-1</sup>) o primeiro registro de mortalidade ocorreu com 25 minutos de exposição, atingindo a taxa de 100% antes do tempo máximo de exposição (240 minutos) (Figura 2C).

Em todas as concentrações que ocorreram as mortalidades, os peixes apresentaram alterações comportamentais como natação errática, letargia, aglomeração na superfície dos tanques, onde tem mais aeração, perda de equilíbrio hidrodinâmico e espasmos musculares. Quanto aos sinais clínicos foram observados, somente nas maiores concentrações, produção excessiva de muco na pele e brânquias, brânquias opacas apresentando descoloração e opacidade de córnea.

Pela aplicação do critério de Zucker (1985), que utiliza os valores de CL<sub>50</sub>-4 h, os óleos essenciais de *P. aduncum* e *L. gracilis* foram classificados como ligeiramente tóxico e *A.*

*triphylla* como praticamente não-tóxico. A  $CL_{50.4h}$  do OE de *A. triphylla* para o tambaqui foi 109,57 mg L<sup>-1</sup>, com um limite inferior de 99,54 mg L<sup>-1</sup> e superior de 113,02 mg L<sup>-1</sup>, considerando um intervalo de 95%. Para *L. gracilis* a  $CL_{50.4h}$  foi de 41,63 mg L<sup>-1</sup>, com limite inferior e superior de 38,82 e 46,18 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Com relação ao OE de *P. aduncum*, a  $CL_{50.4h}$  foi de 48,17 mg L<sup>-1</sup>, com limite inferior de 47,53 mg L<sup>-1</sup> e superior de 49,63 mg L<sup>-1</sup>. As equações da relação dose-resposta dos três OEs são apresentadas na Figura 2.

Com relação as alterações histopatológicas, diferentes danos morfológicos foram observados nas brânquias de juvenis de tambaqui, expostos as diferentes concentrações dos óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum*, como hipertrofia e hiperplasia das células do epitélio lamelar, fusão lamelar, descolamento epitelial, dilatação e constrição capilar, proliferação de células de cloreto e de células mucosas, edema, ruptura epitelial, aneurisma lamelar e necrose (Figura 3 e Tabela 1). Nos tratamentos com os OEs das três plantas, os danos mais frequentes nas lamelas branquiais foram de grau I, principalmente a hiperplasia do epitélio lamelar e fusão lamelar, com baixa frequência de dano de grau II, como a ruptura do epitélio lamelar (Tabela 1). Dano de grau III, como necrose, foi observado somente nas lamelas branquiais expostas ao OE de *P. aduncum*, mas em menor frequência que os demais danos (Tabela 1).

Quanto aos valores médios de IAH para os tratamentos com os OEs de *A. triphylla* e *L. gracilis*, não houve diferença entre as concentrações avaliadas, e estes valores ficaram abaixo de 20, assim como para as menores concentrações de *P. aduncum* (42,5 e 45 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 4A,B,C). Com relação às alterações irreversíveis, estas foram observadas no tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup> do OE de *P. aduncum*, com valores médios de IAH significativamente maiores que as médias registradas para as demais concentrações de *P. aduncum*, assim como em relação ao tratamento controle (Figura 4C).

Considerando a escala do dano tecidual, os valores mais frequentes do índice de alteração histopatológica (IAH) estão entre 11 a 20 e correspondem a danos leves a moderados no órgão (75% para *A. triphylla*, 27,77% para *L. gracilis* e 60% para *P. aduncum*) (Tabela 2). Valores de IAH entre 21 a 50, indicativo de alterações moderadas a severas, foram observados com baixo percentual para os três OEs (Tabela 2). Já as alterações severas e irreparáveis, indicadas por valor de IAH entre 50 e 100 e maiores que 100, foram observadas nas brânquias do tambaqui com emprego do OE de *P. aduncum* (3,33% e 18,33%, respectivamente) (Tabela 2).

#### 4. Discussão

Os óleos essenciais vêm ganhando destaque na aquicultura nos últimos anos, em função da comprovação de várias atividades biológicas em peixes, com destaque para o tratamento de doenças parasitárias e bacterianas (Corral et al., 2018; Ferreira et al., 2019; Costa et al., 2020; Chagas et al., 2020). Soma-se a isso o fato de não apresentarem efeitos nocivos para a saúde humana e para o ambiente (Reverter et al., 2014; Tavares-Dias et al., 2018). Com relação aos OEs das espécies *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum*, estes vem sendo estudados para uso em diferentes protocolos com peixes. Estes OEs constituídos principalmente por terpenos, com composição variável de compostos químicos, tem suas atividades biológicas atribuídas em parte aos seus compostos majoritários, como o  $\beta$ -pineno para *A. triphylla*, o carvacrol para *L. gracilis* e o dilapiol para *P. aduncum*, assim como à sinergia entre os diferentes compostos químicos presentes em seus OEs (Tavares-Dias, 2018). Contudo para que se possa explorar as atividades biológicas desses três OEs, além de conhecer a sua composição química, é necessário conhecer também o potencial tóxico dos OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* para os peixes, em especial para as espécies nativas, cujas informações são escassas (Malheiros et al., 2016; Oliveira et al., 2018; Ferreira et al., 2019; Barriga et al., 2020).

Dados de toxicidade utilizando o óleo essencial de *P. aduncum* são escassos para peixes. As informações disponíveis são com emprego do extrato aquoso de *P. aduncum* para o pirarucu em exposição de 24 horas, com indicação da concentração de 80 ml L<sup>-1</sup>, por não afetar a sobrevivência dos peixes e sua homeostase fisiológica (Queiroz, 2012). Neste estudo, a CL<sub>50</sub>-4h com emprego do OE de *P. aduncum* foi estabelecida em 48,17 mg L<sup>-1</sup> para o tambaqui, mostrando diferença na tolerância dos peixes, em função de diferenças nos protocolos e nos produtos obtidos (extrato aquoso e óleo essencial) de *P. aduncum*. Destaca-se que o dilapiol esteve presente em 80,7% do OE de *P. aduncum* utilizado neste estudo, enquanto para o extrato alcoólico estas informações não estão disponíveis. Por outro lado, para organismos de diferentes níveis tróficos (plantas, algas e nematoides), Miura et al. (2021) relataram que o OE de *P. aduncum* (dilapiol, correspondendo a 75,5% do OE) afeta o crescimento e a mortalidade destes, com maior sensibilidade apresentada por microcrustáceos. Esse conjunto de informações ressaltam a importância das avaliações ecotoxicológicas no estabelecimento de concentrações seguras para os organismos alvo e não alvo.

Plantas do gênero *Lippia* têm sido utilizadas para indução anestésica em peixes e no tratamento de doenças (Barriga et al., 2020; Brandão et al., 2021; Monteiro et al., 2021). Com relação ao OE de *L. origanoides*, a concentração letal média 96 horas para o tambaqui foi estabelecida em 15,2 mg L<sup>-1</sup> (Oliveira et al., 2018). Este valor é inferior ao observado neste

estudo para o OE de *L. gracilis*, que também possui o carvacrol (49,7%) em sua composição com valores próximos aos da composição do OE utilizado neste estudo (42,2%). Com relação a  $CL_{50}$ , a diferença nos resultados pode estar relacionada ao tempo de exposição, que neste estudo foi de 4 horas, possibilitando o tambaqui tolerar uma concentração mais elevada ( $CL_{50-4h}$  de 41,63 mg L<sup>-1</sup>), bem como ao efeito combinado dos outros constituintes do OE. Em outro estudo de toxicidade utilizando OE de *L. grata*, heterotípico de *L. gracilis*, o tambaqui tolerou 700 mg L<sup>-1</sup> por 30 minutos, sendo observado efeito anestésico deste OE a partir de cinco minutos de exposição, mas sem mortalidade dos peixes, sendo esta concentração recomendada para uso em banhos terapêuticos (Barriga et al., 2020). Diferenças nos protocolos de avaliação, no tamanho dos peixes, que para *L. grata* foi de 30 g, são razões apontadas para a diferença encontrada na tolerância do tambaqui ao OE, uma vez que o percentual dos principais constituintes químicos do OE de *L. grata*, carvacrol (48,12%) e *p*-cimeno (24,39%), foram próximos ao encontrado no presente estudo para *L. gracilis* (42,2% e 11,2%, respectivamente).

*A. triphylla* é um dos OEs bastante estudado na aquicultura com respeito à sua atividade anestésica (Santos et al., 2017; Almeida et al., 2019). Para tambaqui, com o emprego de 150 mg L<sup>-1</sup> do OE de *A. triphylla*, por 4,7 minutos, os peixes atingiram a indução anestésica, sem mortalidade dos peixes (Brandão et al., 2021). Neste estudo de toxicidade, não houve registro de mortalidade dos tambaquis dentro dos primeiros minutos ou horas de exposição ao OE de *A. triphylla*, conforme relatado por Brandão et al. (2021), porém a partir de 3 horas de exposição às maiores concentrações (120 e 140 mg L<sup>-1</sup>) e de 4 horas nas demais concentrações (80 e 100 mg L<sup>-1</sup>) foram registradas mortalidades dos peixes, com determinação da  $CL_{50-4h}$  para o tambaqui em 109,57 mg L<sup>-1</sup>. Comparado aos outros OEs (*L. gracilis* e *P. aduncum*), o tambaqui apresentou maior tolerância ao OE de *A. triphylla*, em cuja composição estão presente os compostos  $\beta$ -pineno (22,1%), *trans*-pinocanfona (13,1%) e acetato de *trans*-pinocarvila (7,6%). Conforme o critério de Zucker (1985), o OE de *A. triphylla* é classificado como praticamente não-tóxico, enquanto os OEs de *L. gracilis* e *P. aduncum* foram classificados como ligeiramente tóxico, devendo-se ter atenção quando do seu uso em protocolos de tratamento de doenças para o tambaqui.

Diferentes danos morfológicos foram observados neste estudo nas brânquias dos peixes expostos aos OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum*, sendo mais frequentes os danos de grau I como hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, fusão lamelar, descolamento do epitélio e proliferação de células de cloreto. Esses mesmos danos foram observados por Brandão et al. (2021) em tambaquis expostos aos OEs de *A. triphylla*, *Lippia sidoides* e *M. piperita* e por Soares et al. (2017a) em tambaquis expostos ao OE de *L. sidoides*. Alterações

como hipertrofia e hiperplasia epitelial lamelar são consideradas uma resposta comum e inespecífica a danos branquiais subagudos a crônicos (Strzyzewska et al., 2016), e em conjunto com as demais alterações pode ser indicativo de uma condição de estresse, pois evidenciam a ativação funcional do órgão de osmorregulação (Spanghero et al., 2019; Vieira et al., 2019). Neste estudo, os danos de grau II, como a ruptura do epitélio lamelar e aneurisma lamelar, ocorreram em baixa frequência e foram registrados após exposição aos três OEs avaliados. Esses danos são mais severos e podem comprometer o funcionamento das brânquias, que é o órgão responsável pelas trocas gasosas e iônicas, mas são reparáveis se as condições adversas forem controladas (Bernet et al., 1999).

A análise semi-quantitativa dos danos branquiais, evidenciado pelos valores médios de IAH, mostrou que os peixes expostos ao OE de *A. triphylla* apresentaram dano leve a moderado (75%), com o valor médio de IAH variando de 12,5 a 17,6; padrão este observado por Brandão et al. (2021) que evidenciaram funcionamento normal (75%) e danos leves a moderado nas brânquias de tambaqui (16,7%) com emprego do mesmo OE, durante indução anestésica, na concentração de 150 mg L<sup>-1</sup>. Para o OE de *L. gracilis* o IAH variou de 9,6 a 14,1, com funcionamento normal (63,88%) e danos leves a moderado nas brânquias dos peixes (27,77%). Estes resultados são similares aos observados com o OE de *L. origanoides*, que tem o carvacrol como composto majoritário deste OE (49,7%) e em percentual próximo ao do OE de *L. gracilis*, com a descrição de danos moderados a graves, com o emprego de 40 mg L<sup>-1</sup> por 30 minutos, mas que após 24 horas de recuperação foram classificados como danos leves a moderados (Soares et al., 2017b). Já nas maiores concentrações de *P. aduncum* (47,5, 50 e 52,5 mg L<sup>-1</sup>) as brânquias foram mais afetadas, com valores de IAH variando de 48,83 a 65,33. Na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> foram observadas alterações severas e irreversíveis nas brânquias dos peixes, como a necrose (dano de grau III). Com o OE de duas espécies de *Lippia* também foram observados danos severos e irreparáveis nas brânquias de tambaqui, com o emprego do OE de *L. alba* por 30 minutos, nas concentrações de 100 e 150 mg L<sup>-1</sup>, com o IAH variando entre 66 e 121, respectivamente (Soares et al., 2016) e com o OE de *L. sidoides* (20 mg L<sup>-1</sup> por 15 minutos), cujo valor médio de IAH foi de 119,5, e em ambos os casos houve destaque para a ocorrência de necrose lamelar (Soares et al., 2017a).

É importante destacar que a ocorrência de aneurisma é decorrente do colapso do sistema de células pilares e que pode culminar na ruptura do epitélio lamelar (dano de grau II), sendo essas alterações reversíveis caso a condição predisponente seja ajustada, mas caso a exposição ao agente agressor seja prolongada os danos podem progredir para o grau III, como a necrose (Poleksic; Mitrovic-Tutundzic, 1994; Winkaler et al., 2007). Estas alterações foram observadas



neste estudo nas concentrações mais altas dos OEs de *P. aduncum*, *L. gracilis* e *A. triphylla*, sendo responsáveis pelo maior grau de comprometimento das brânquias e consequente redução da capacidade respiratória dos peixes, culminando na mortalidade destes. Portanto, o emprego das informações morfológicas em conjunto com os valores de CL<sub>50</sub>-4 h dos OEs avaliados neste estudo é de grande importância para o estabelecimento de concentrações seguras a serem utilizadas em protocolos de tratamento de doenças do tambaqui.

## 5. Conclusão

Os óleos essenciais de *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* foram classificados como ligeiramente tóxico e *Aloysia triphylla* como praticamente não-tóxico para tambaquis. Pelo índice de alteração histológica, a maioria dos danos nas brânquias dos peixes com emprego dos óleos essenciais foram categorizados como leves a moderados, mas com baixa frequência de danos severos como aneurisma, além de danos irreversíveis como necrose nas maiores concentrações do óleo essencial de *P. aduncum*. Estes óleos essenciais podem ser utilizados com parcimônia, em menores concentrações e períodos de exposição.

## Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (10.19.00.038.00.00) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas - Fapeam (Edital 002/2018, Universal Amazonas) pelo apoio financeiro. Ao assistente José Marconde da Costa e Silva, da Embrapa Amazônia Ocidental, e à bolsista Nilce Ellen dos Santos pelo auxílio na coleta de material biológico dos peixes.

## Referências

- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION), 1992. Standard methods for the examination of water and waster. 18ed. Washington, DC: American Public Health Association, p.1050.
- Andrade-Porto, S.M., Affonso, E.G., Malta, J.C.O., Roque, R., Ono, E.A., Araújo, S.O., Tavares-Dias, M., 2017. Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas*. *Aquaculture* 479, 38-44.
- Almeida, A.P.G., Correia, T.G., Heinzmann, B.M., Val, A.L., Baldisserotto, B., 2019. Stress-reducing and anesthetic effects of the essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* on *Serrasalmus eigenmanni* (Characiformes: Serrasalminidae). *Neotrop. Ichthyol.* 17(2), e190021.

- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Diseases.*, 22(1), 25-34.
- Bancroft, J.D., Gamble, M. 2008. Theory and practice of histological techniques. 6th Edition, Churchill Living Stone, Elsevier, China.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Moreira, K.L.S., Rocha, M.I.U.M., Veiga, M.L., Baldisserotto, B., 2017. *Melaleuca alternifolia* essential oil prevents oxidative stress and ameliorates the antioxidant system in the liver of silver catfish (*Rhamdia quelen*) naturally infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Aquaculture* 480, 11–16.
- Barriga, I.B., Gonzales, A.P.F., Brasiliense, A.R.P., Castro, K.N.C., Tavares-Dias, M., 2020. Essential oil of *Lippia grata* (Verbenaceae) is effective in the control of monogenean infections in *Colossoma macropomum* gills, a large Serrasalminidae fish from Amazon. *Aquac. Res.* 51, 3804-3812.
- Brandão, F.R., Farias, C.F.S., Souza, D.C.M., Oliveira, M.I.B., Matos, L.V., Majolo, C., Oliveira, M.R., Chaves, F.C.M., O’Sullivan, F.L.A., Chagas, E.C., 2021. Anesthetic potential of the essential oils of *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* for *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 534, 736-275.
- Campos, C.M., Rodrigues, R.A., Oliveira, C.A.L., Nunes, A.L., Fantini, L.E., Ushizima, T.T., 2014. Permanganato de potássio como agente terapêutico no controle de *Epistylis* sp. em cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* e seus efeitos na hematologia. *Bol. Inst. Pesca* 40(2), 157–166.
- Chagas, E.C., Aquino-Pereira, S.L., Benavides, M.V., Brandão, F.R., Monteiro, P.C., Maciel, P.O., 2019. *Neoechinorhynchus buttnerae* parasitic infection in tambaqui (*Colossoma macropomum*) on fish farms in the state of Amazonas. *Bol. Inst. Pesca* 45(2), 1-6.
- Corral, A.C.T., Queiroz, M.N., Andrade-Porto, S.M., Morey, G.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.
- 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 *Colossoma macropomum*. *Aquac. Report.* 18, 100414. 1-9.

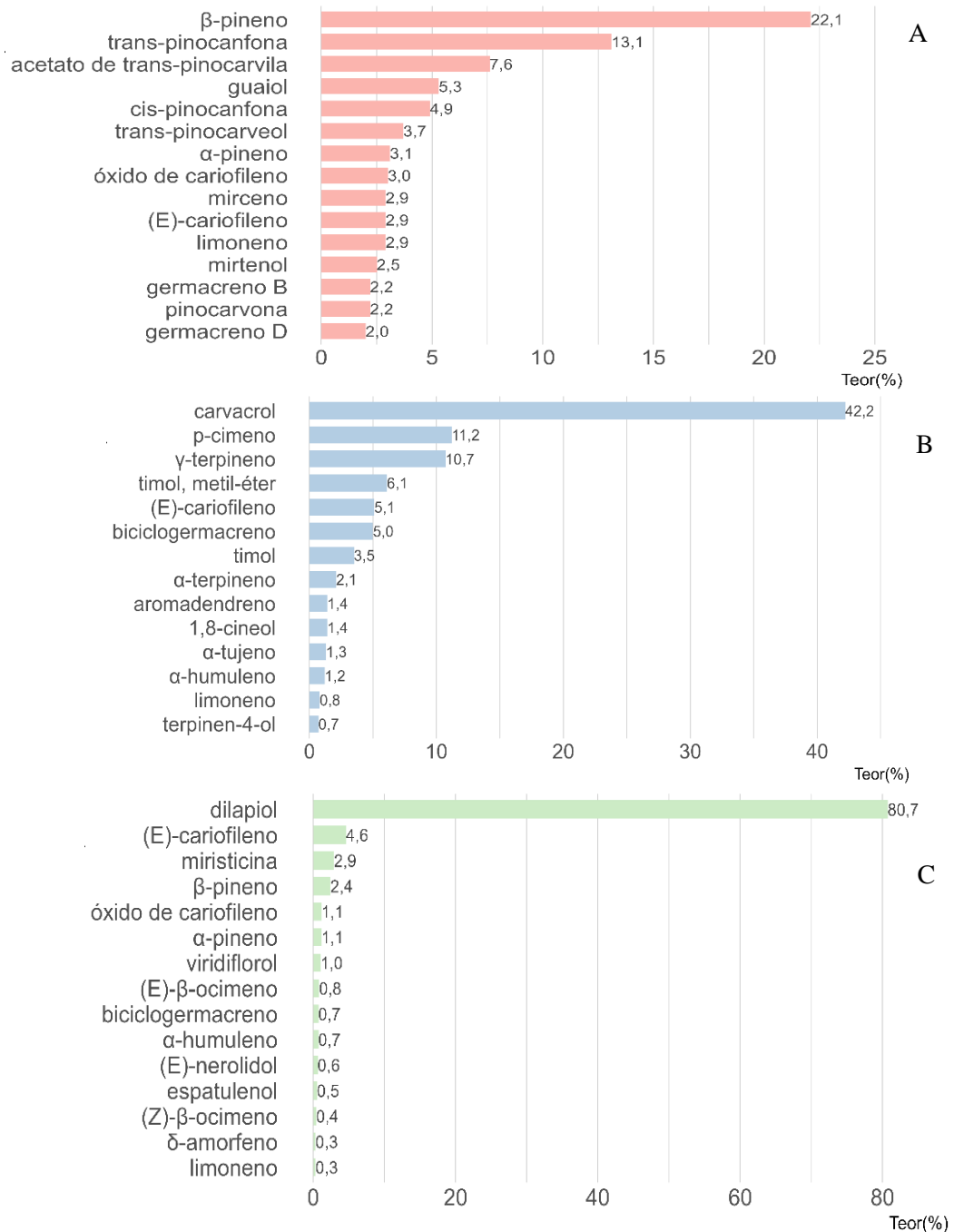
- Cunha, J.A., Scheeren, S.A., Salbego, J., Gressler, L.T., Madaloz, L.M., Junior, J.B., Bianchini, A.E., Pinheiro, C.G., Bordignon, S.A.L., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2017. Essential oils of *Cunila galioides* and *Origanum majorana* as anesthetics for *Rhamdia quelen*: efficacy and effects on ventilation and ionoregulation. *Neotrop. Ichthyol.* 15(1), e160076.
- Dewi, R.R., Siallagan, W., Suryanto, D., 2018. The efficacy of sodium chloride application and the control of fish lice (*Argulus* sp) infection on tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Acta Aquatica. Aquatic. Sci. J.* 5(1), 4-7.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The state of World Fisheries and Aquaculture 28, 2020. Acessado em 03 de setembro de 2021.
- Farias, C.S.F., Brandão, F.R., Sebastião, F.A., Souza, D.C.M., Monteiro, P.C., Majolo, C., Edsandra, C.C., Albendazole and praziquantel for the control of *Neoechinorhynchus butnerae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquac. Inter.* 29, 1495 – 1505.
- Ferreira, L.C., Cruz, M.G., Lima, T.B.C., Serra, B.N.V., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Ventura, A.S., Jerônimo, G.T., 2019. Antiparasitic activity of *Mentha piperita* (Lamiaceae) essential oil against *Piscinoodinium pillulare* and its physiological effects on *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture* 512, 734-343.
- Fujimoto, R.Y., Hide, D.M.V., Paixão, P.E.G., Abe, H.A., Dias, J.A.R., Sousa, N.S., Couto, M.V.S., Silva, R.V.B., Madi, R.R., Benavides, M.V., Ishikawa, M.M., Chagas, E.C., Boijink, C.L., Dompieri, M.H.G., Pereira, A.M.L., Maciel, P.O., 2019. Fauna parasitária e relação parasito-hospedeiro de tambaquis criados na região do Baixo São Francisco, nordeste do Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 71(2), 563-570.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719.
- Izel, A.C.U., Crescêncio, R., O'Sullivan, F.F.L., Chagas, E.C., Boijink, S.L., Silva, J.I., 2013. Produção intensiva de tambaqui em tanques escavados com aeração. Embrapa Amazônia Ocidental (Circular técnica 39); 4p, Manaus, AM, 2013. Disponível em: <https://www.aquamat.com.br/wp>. Acesso em 09 de setembro de 2021.
- Lucena, D.C., Bertholdo-Vargas, L.R., Silva, W.C., Machado, A.F., Lopes, T.S., Moura, S., Neiva, M.B., 2017. Biological activity of *Piper aduncum* extracts on *Anticarsia siagemmatialis* (Hübner) (Lepidoptera: Erebiidae) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *An. Acad. Bras. Cienc.* 89(3), 1869–1879.

- Maciel, P.O., Garcia, F., Chagas, E.C., Fujimoto, R.Y., Tavares-Dias, M., 2018. Trichodinidae in commercial fish in South America. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 28, 33-56.
- Miura, P.T., Queiroz, S.C.N., Jonsson, C.M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Reyes, F.G., 2021. Study of the chemical composition and ecotoxicological evaluation of essential oils in with potential use in aquaculture. *Aquac. Res.* 52, 3415-3424.
- Oliveira, S.R.N., Oliveira, M.A.S., Brandão, F.R., Majolo, C., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., 2018. Toxicity of *Lippia origanoides* essential oil in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its effect against *Aeromonas hydrophila*. *Bol. Inst. Pesca* 44(2), 1-7.
- Oliveira, M.I.B., Brandão, F.R., Silva, M.J.R., Rosa, M.C., Farias, C.F.S, Santos, D.S., Majolo, C., Oliveira, M.R., Chaves, F.C.M, Bizzo, H.R., Tavares-Dias, M., Chagas, E.C., 2021. In vitro anthelmintic efficacy of essential oils in the control of *Neoechinorhynchus buttnerae*, an endoparasite of *Colossoma macropomum*. *J. Essent. Oil Res.* 33, 1-14.
- Prophet E.B. AFIP Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Force Registry of Pathology, Washington, DC. 279p. 1992.
- Poleksić, V., Mitrović-Tutundžić, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *Sublethal chronic Eff. Pollut. Freshw. fish.* Oxford Fish. News Books p. 339–352.
- PEIXE BR. Anuário brasileiro de piscicultura. 2021. 71p. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuariopeixe-br-da-piscicultura-2021/>>. Acessado em 09 de Setembro de 2021.
- Pereira, J.N., Morey, G.A.M., 2018. First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacanthocephala, Neochinorhynchidae) on *Colossoma macropomum* (Characidae) in a fish farm in Roraima, Brazil. *Acta. Am.* 48(1), 42-45.
- Queiroz, M.N., 2012. Efeito do extrato aquoso da *Piper aduncum* L no controle de parasitas monogenéticos (Platyhelminthes: Monogenoidea) e parâmetros fisiológicos do pirarucu *Arapaima gigas* (SCHINZ 1822). UniNilton Lins, Brazil. 83p. (Dissertação de mestrado).
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P., 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433, 50–61.
- Santos, A.C., Junior, G.B., Zago, D.C., Zeppenfeld, C.C., Silva, D.T., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., Cunha, M.A., 2017. Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Vet. Anaesth. Analg.* 44(1), 106–113.

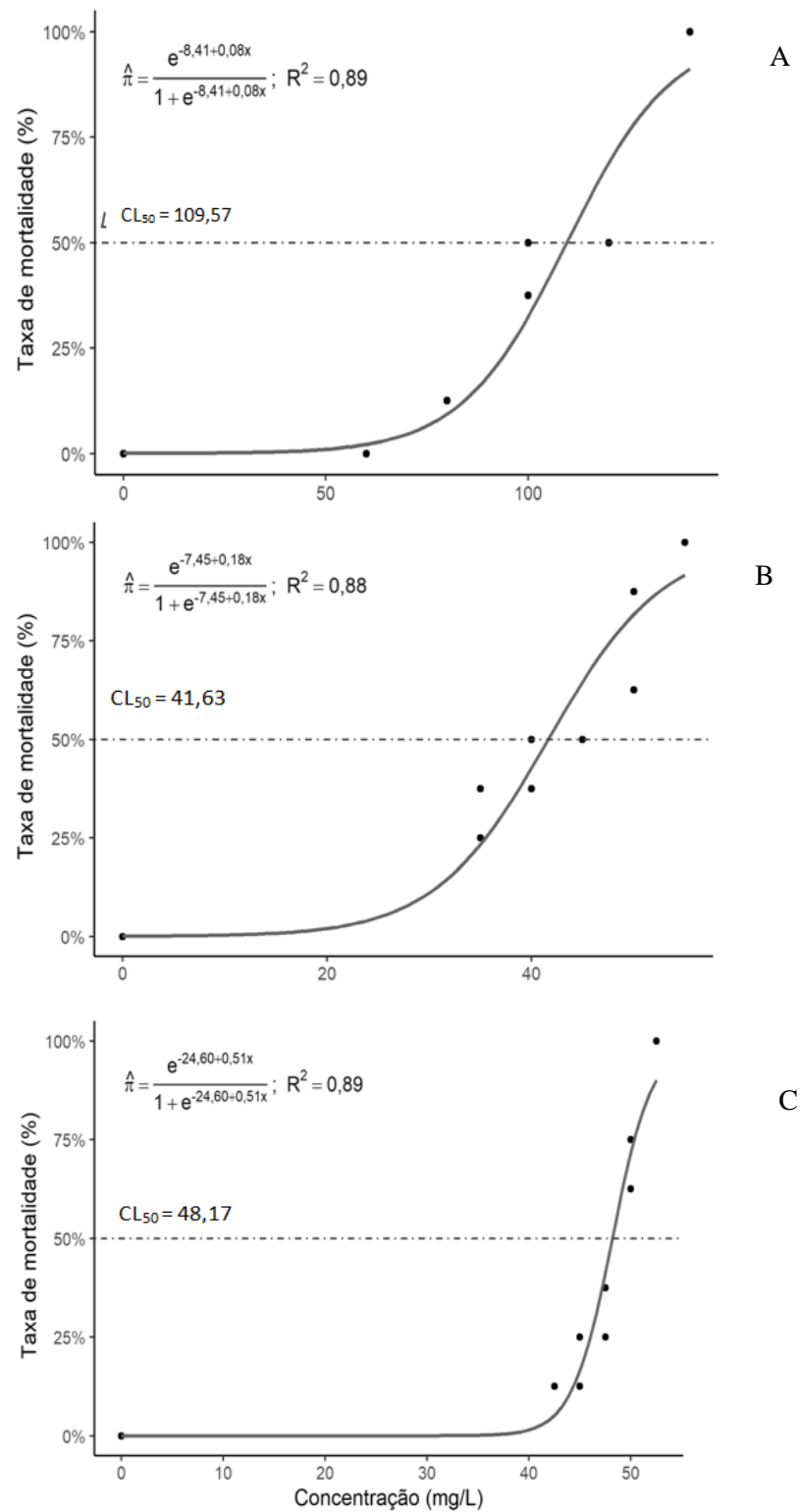
- Santos, M.A., Peixoto, J.S., Madi, R.R., Espósito, T.S., 2018. Protozoan and metazoan parasites of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum* farmed in the Lower São Francisco, Brazil. *Acta Fisheries Aquatic Res.* 6(1), 29-34.
- Shinn, A.P., Pratoomyot, J., Bron, J., Brooker, A., 2015. Economic impacts of aquatic parasites on global fin fish production. *Glob. Aquacult. Advocate*, p. 82–84.
- Soares, B.V., Neves, L.R., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Dias, M.K.R., Chagas, E.C., Tavares-Dias, M., 2016. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture* 452, 107–114.
- Soares, B.V., Neves, L.R., Ferreira, D.O., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Tavares-Dias, M., 2017. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Vet. parasitol.* 234, 49-56.
- Soares, B.V., Cardoso, A.C.F., Campos, R.R., Gonçalves, 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 origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 469, 72-78.
- Sousa, R.L., Santos, I.G.C., Silva, K.E.R., Barcelos, J.F.M., Costa, O.T.F., Santos, M.C., 2020. Infectious agents and parasites that affect tambaqui (*Colossoma macropomum*) and treatments used to control these pathogens: a systematic review. *Sci. Am.* 9(3).
- Spanghero, D.B.N., Spanghero, E.C.A.M., Pedron, J.S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Zaniboni-Filho, E., 2019. Peppermint essential oil as an anesthetic for and toxicity to juvenile silver catfish. *Pesq. Agropec. Brasileira* 54, e00367.
- Strzyzewska, E., Szarek, J., Babinska, I., 2016. Morphologic evaluation of the gills as a tool in the diagnostics of pathological conditions in fish and pollution in the aquatic environment: a review. *Vet. Med.* 61(3), 123–132.
- Tavares-Dias, M., 2021b. Toxic, physiological, histomorphological, growth performance and antiparasitic effects of copper sulphate in fish aquaculture. *Aquaculture* 535, 736350.
- Tavares-Dias, M., 2021a. Toxicity, physiological, histopathological and antiparasitic effects of the formalin, a chemotherapeutic of fish aquaculture. *Aquacult. Res.* 52, 1803-1823.
- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *J. Parasitol. Diseases* 41(4), 913-918.
- Valenti, W.C., Barros, H.P., Moraes-Valenti, P; Bueno, G. w; Cavalli, R. O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. 2021. *Aquacult. Rep.* 19, 100611.

- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2018. South American fish for continental aquaculture. *Rev. Aquacult.* 10(2), 351–369.
- Vieira, J.A.R.A., Silva, G.S., Matos, L.V., Oliveira, M.I.B., Val., A.V.M.F., 2019. Avaliação dos efeitos do Roundup® e da hipóxia sobre os parâmetros hematológicos e histologia branquial de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Sci. Am* 8, 16-28.
- Winkaler, E.U., Santos, T.R.M., Machado-Neto, J.G., Martinez, C.B.R., 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145, 236-244.
- Zhu, F., 2020. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture* 526, 735422.
- Zucker, E., 1985. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. USEPA Publication, 540(9), 85-106.

## FIGURAS E TABELAS

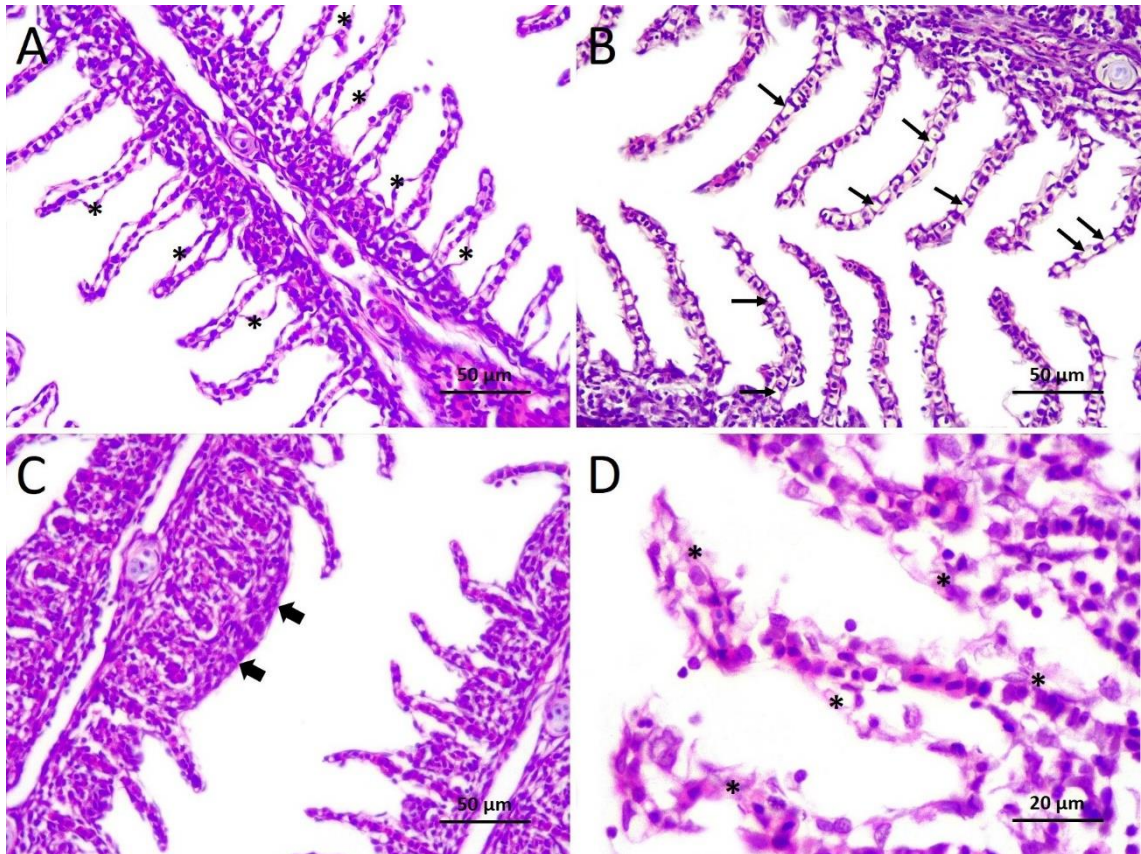


**Figura 1.** Representação dos compostos majoritários dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* (A), *Lippia gracilis* (B) e *Piper aduncum* (C).



**Figura 2.** Taxa de mortalidade (%) de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, submetidos a diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* (A), *Lippia gracilis* (B) e *Piper aduncum* (C) durante 4 horas, e estimativas da concentração média letal ( $CL_{50}$ ).

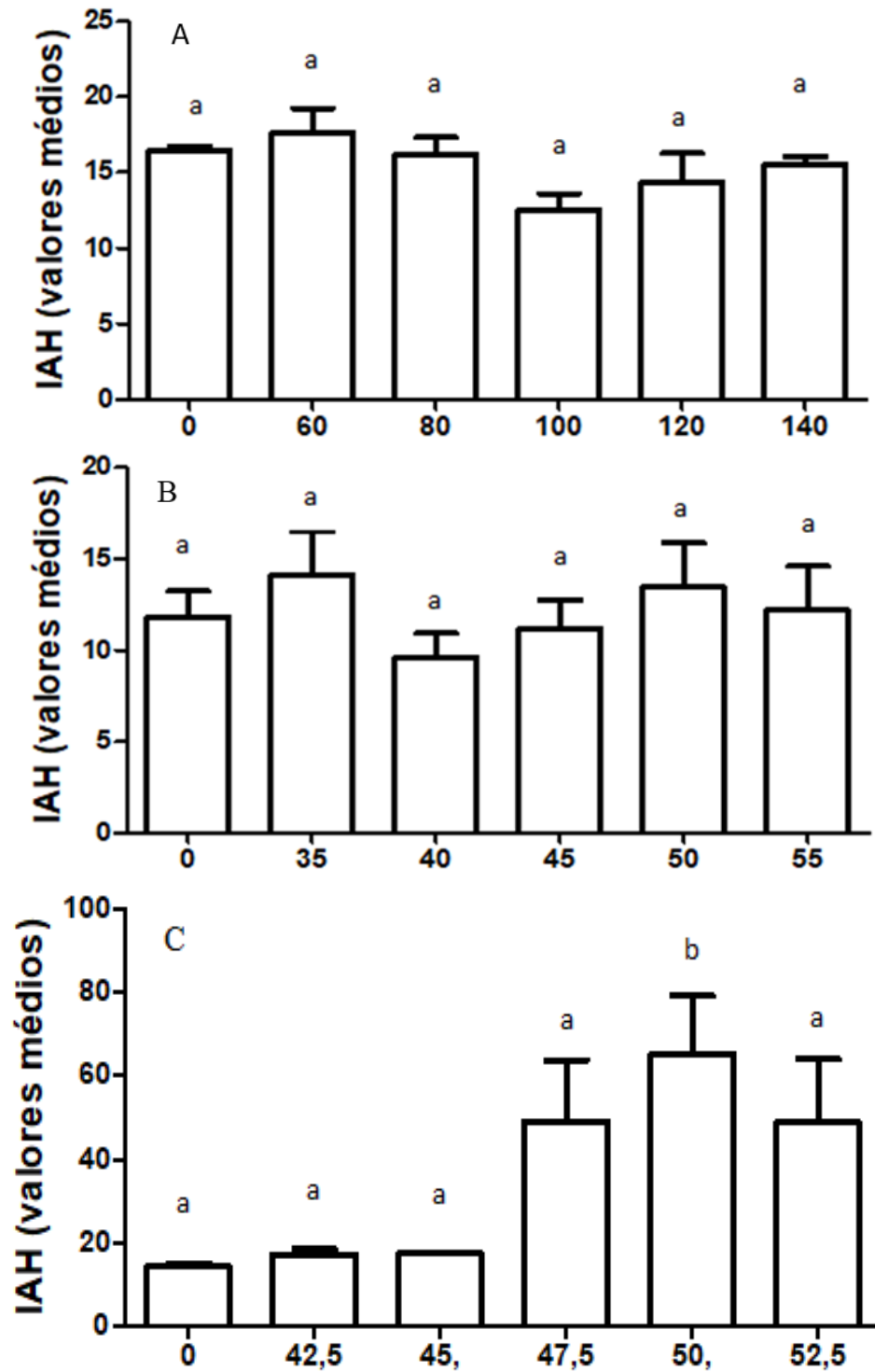




**Figura 3.** Identificação dos danos histopatológicos observados nas brânquias de *Colossoma macropomum*, após 4 horas de exposição aos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum*. A: Descolamento epitelial (asteriscos) na concentração de 40 mg L<sup>-1</sup> do óleo essencial de *L. gracilis*. B: Dilatação capilar nas lamelas branquiais dos peixes expostos a 50 mg L<sup>-1</sup> do óleo essencial de *P. aduncum* (seta). C: Fusão lamelar observada na concentração de 35 mg L<sup>-1</sup> do óleo essencial de *L. gracilis* (seta grossa). D: Necrose observada nas brânquias dos peixes expostos a 50 mg L<sup>-1</sup> do óleo essencial de *P. aduncum*, com áreas de degeneração citoplasmática (asteriscos).

**Tabela 1.** Frequência relativa (%) dos danos histopatológicos em brânquias de *Colossoma macropomum*, após exposição aos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum*.

Alterações histopatológicas	Grau	Óleos		
		<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Lippia gracilis</i>	<i>Piper aduncum</i>
Hipertrofia do epitélio lamelar	Grau I	12,28	13,72	12,13
Hiperplasia do epitélio lamelar	Grau I	12,85	13,90	12,58
Fusão lamelar	Grau I	10,20	11,27	8,60
Descolamento do epitélio	Grau I	12,85	13,90	11,96
Dilatação capilar	Grau I	9,64	12,59	9,92
Constrição capilar	Grau I	3,96	8,08	5,50
Proliferação de células de cloreto	Grau I	12,85	13,72	12,58
Proliferação de células mucosas	Grau I	8,50	4,13	7,79
Edema	Grau I	6,23	2,44	5,56
Ruptura epitelial (hemorragia)	Grau II	2,64	3,94	1,37
Aneurisma lamelar	Grau II	7,93	2,25	8,21
Necrose	Grau III	0	0	3,77
Total (%)		100	100	100



**Figura 4.** Valores médios do índice de alteração histopatológica (IAH) nas brânquias de *Colossoma macropomum* expostos aos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* (A), *Lipia gracilis* (B) e *Piper aduncum* (C). Letras diferentes sobre a barra indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Frequência relativa (%) por escala do índice de alteração histopatológica (IAH) observado em brânquias de *Colossoma macropomum*, após exposição aos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum*.

Escala de IAH	Óleo essencial			Interpretação
	<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Lippia gracilis</i>	<i>Piper aduncum</i>	
0 a 10	20,00	63,88	13,33	Funcionamento normal do órgão
11 a 20	75,00	27,77	60,00	Danos leves a moderados no órgão
21 a 50	4,16	8,33	5,00	Alterações moderadas a severas no órgão
50 a 100	0,00	0,00	3,33	Alterações severas no órgão
> 100	0,00	0,00	18,33	Danos irreparáveis no órgão

## Capítulo 2

**Eficácia dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* no controle de *Piscinoodinium pillulare* (Shaperclaus, 1954) em *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)**

Artigo elaborado conforme as normas da Aquaculture

**Eficácia dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* no controle de *Piscinoodinium pillulare* (Shaperclaus, 1954) em *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)**

Paula Ribeiro dos Santos<sup>a</sup>; Sanny Maria de Andrade Porto<sup>b</sup>; Franmir Rodrigues Brandão<sup>a</sup>; Damy Caroline de Melo Souza<sup>c</sup>; Maria Juliete Souza Rocha<sup>a</sup>; Fernanda de Alexandre Sabastião<sup>a</sup>; Caio Francisco Santana Farias<sup>d</sup>; Marcelo Róseo de Oliveira<sup>e</sup>; Francisco Célio Maia Chaves<sup>e</sup>; Edsandra Campos Chagas<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros - PPGCARP, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil.

<sup>b</sup>Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos - LASAA, Departamento de Ciências Pesqueiras, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil.

<sup>c</sup>Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGGIBA, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil.

<sup>d</sup>Laboratório de Saúde de Organismos Aquáticos - AQUOS, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>e</sup>Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil.

## **Resumo**

O objetivo deste estudo foi determinar a eficácia dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* no controle de *Piscinoodinium pillulare* em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), bem como as alterações hematológicas, bioquímicas e enzimáticas após aplicação de banhos terapêuticos. Foram avaliados sete tratamentos, com três repetições, sendo eles: controle, óleo essencial de *A. triphylla* (40 e 50 mg L<sup>-1</sup>), OE de *L. gracilis* (20 e 30 mg L<sup>-1</sup>) e OE de *P. aduncum* (10 e 20 mg L<sup>-1</sup>). Os peixes foram expostos a três banhos de 15 minutos com o OE, a cada 24 horas. Após os tratamentos com os óleos essenciais, a contagem do *P. pillulare* foi feita em câmara de sedgewick rafter utilizando três alíquotas de cada amostra. Para avaliar o estado fisiológico dos peixes foram determinados o hematócrito, número de eritrócitos, hemoglobina, glicose, proteínas totais, bem como a atividade das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. A eficácia do OE no controle de *P. pillulare* variaram de 63,8 a 83,8%, sendo os maiores valores obtidos com emprego do OE de *P. aduncum*. Com relação aos parâmetros hematológicos e bioquímicos, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com os OEs, mas a infecção

por *P. pillulare* promoveu redução nos valores de hematócrito e hemoglobina, além de aumento na glicose plasmática e proteínas totais. Houve redução significativa nos valores da alanina aminotransferase (ALT) com o OE de *P. aduncum* e *A. triphylla* em comparação aos tratamentos com OE de *L. gracilis*, mas não comprometeram a função hepática em tambaquis. Portanto, os OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* são indicados para o tratamento de tambaquis infestados por *P. pillulare*.

**Palavras-chave:** banhos terapêuticos, parâmetros sanguíneos, parasitos, produtos naturais, *Colossoma macropomum*.

## 1. Introdução

A produção de peixes no Brasil está em pleno crescimento, com alta de 5,93% em 2020, atingindo 802.930 toneladas. As espécies nativas contribuem para esse resultado com 278.671 toneladas em 2020, mantendo o segundo lugar, mas com uma queda de 3,2% no total produzido (PEIXE BR, 2021). O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), mantém-se em destaque como a espécie nativa mais produzida (Valenti et al., 2021), todavia dados do IBGE (2020) indicam queda de 10,4% em 2019, quando comparado com a produção de 2016, principalmente devido a problemas climáticos, sanitários e de mercado.

Dentre os parasitos que acometem o tambaqui, o acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) e o dinoflagelado *Piscinoodinium pillulare* (Shaperclaus, 1954) vêm chamando atenção nos estudos epidemiológicos realizados em pisciculturas, em especial no Norte do país (Sant`Ana et al., 2012; Gomes et al., 2018; Chagas et al., 2019; Fujimoto et al., 2019; Arbildo-Ortiz et al., 2020). Com relação ao dinoflagelado *P. pillulare*, este é responsável por causar a piscinodiniase, conhecida popularmente como doença do veludo e/ou ferrugem (Martins et al., 2015; Ferreira-Júnior et al., 2018).

O parasito *P. pillulare* possui ciclo de vida direto, apresenta como característica o formato de saco ou pêra, cor castanho-amarelada, a presença de cloroplastos dentre as suas organelas e um disco de fixação composto de rizocistos que penetram nas células dos hospedeiros, sendo sua característica parasitária decorrente de sua ação oportunista na fixação e danos no tegumento e brânquias dos peixes (Marchiori & Martins, 2013; Martins et al., 2015). A patogenia provocada por este parasito promove aumento da produção de muco, hemorragia no tegumento, degeneração e necrose das células, inflamação, além de hiperplasia e fusão das lamelas secundárias, levando a um quadro grave de problemas respiratórios com perdas de até 90% do plantel (Sant`Ana et al., 2012; Ferreira-Júnior et al., 2018).

Para redução da carga de ectoparasitos em peixes são utilizados produtos químicos como sulfato de cobre, cloreto de sódio, permanganato de potássio, formalina, entre outros, mas com efeitos adversos em altas concentrações para os peixes, ambiente e saúde humana (Martins et al., 2017; Tavares-Dias, 2021a, b), o que tem despertado a busca por alternativas naturais para promover a aquicultura sustentável, como os produtos de origem vegetal (Tavares-Dias, 2018; Zhu, 2020; Dawood et al., 2021). Nesse sentido, os óleos essenciais (OEs) se destacam devido às atividades biológicas de seus compostos bioativos, a exemplo da atividade antiparasitária em peixes (Corral et al., 2018; Tavares-Dias, 2018; Ferreira et al., 2019), bem como em razão de suas propriedades biodegradáveis, baixa toxicidade, fácil obtenção e menor possibilidade de causar resistência parasitária (Tavares-Dias, 2018; Zhu, 2020; Dawood et al., 2021).

O OE das espécies *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* apresentam propriedades bactericida, acaricida, larvicida, moluscida, antihelmíntica e antiprotozoária (Lorenzi & Matos, 2008; Corral et al., 2018; Tavares-Dias, 2018). Entretanto, informações sobre a eficácia destes OEs no tratamento de *P. pillulare* em tambaqui, e os efeitos secundários desta exposição são escassas (Ferreira et al., 2019). Essa lacuna do conhecimento científico precisa ser elucidada dado o aumento de registros de mortalidade nos sistemas de cultivo em decorrência de infestações por *P. pillulare*. Além disso, o quadro é agravado devido à restrição do tratamento convencional (Sant’Ana et al., 2012; Ferreira-Júnior et al., 2018; Arbildo-Ortiz et al., 2020).

O objetivo deste estudo foi determinar a eficácia dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* no tratamento de *Piscinoodinium pillulare* em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), bem como as alterações hematológicas, bioquímicas e enzimáticas após aplicação de banhos terapêuticos.

## 2. Material métodos

### 2.1. Extração e caracterização química dos óleos essenciais

Espécimes de plantas de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* foram cultivadas na divisão de plantas medicinais e hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, Amazonas, Brasil). Folhas e inflorescências foram coletadas e secas em temperatura ambiente, e após secagem os óleos essenciais destes materiais foram extraídos pelo método de hidrodestilação, por meio de aparelho de Clevenger, por cerca de duas horas. Ao final da extração, amostras do óleo essencial foram recolhidas e enviadas para análises da sua



composição química por cromatografia gasosa e espectrometria de massa na Embrapa Agroindústria de Alimentos, conforme descrito em Oliveira et al. (2021).

## 2.2. Aquisição, aclimatação e análise parasitária dos peixes

Juvenis de tambaqui, *C. macropomum* (n=230, 272,43 ± 84,08 g; 25,38 ± 2,73 cm) foram obtidos em uma piscicultura comercial do município de Iranduba (Manaus, AM, Brasil). Os peixes foram transportados para o setor de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, onde foram aclimatados por 14 dias em tanques de 1000 L, com sistema de circulação de água, aquecimento e aeração constantes. Durante aclimatação os peixes foram alimentados com ração extrusada comercial para peixes onívoros, contendo 32% de proteína bruta, até a saciedade aparente, duas vezes ao dia.

A infecção natural dos peixes pelo dinoflagelado *P. pillulare* foi confirmada pela visualização dos sinais clínicos e análise das brânquias dos peixes (n=20) em microscópio óptico, conforme metodologia descrita por Maciel et al. (2018). A prevalência de *P. pillulare* foi de 100%, com intensidade média e abundância média de 18.600± 1.837,38.

Este estudo foi desenvolvido com a aprovação de seu protocolo pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental (protocolo nº 02/2019).

## 2.3. Desenho experimental

Os peixes (n=210) foram distribuídos em 21 tanques de 1000 L, em delineamento experimental inteiramente casualizado, compondo sete tratamentos com três repetições, sendo eles: controle (água do tanque de cultivo), OE de *A. triphylla* (40 e 50 mg L<sup>-1</sup>), OE de *L. gracilis* (20 e 30 mg L<sup>-1</sup>) e OE de *P. aduncum* (10 e 20 mg L<sup>-1</sup>). As concentrações dos OEs foram definidas em testes de toxicidade (Santos, 2021) e aplicadas em protocolo de banhos terapêuticos, sendo os OEs diluídos em álcool etílico (1:10) e misturados na água dos tanques.

Os banhos terapêuticos foram realizados em tanques com o volume fixo de 60 L, sendo os banhos aplicados com duração de 15 minutos e repetidos por três dias consecutivos de acordo com Meneses et al. (2018). Após o terceiro banho, os peixes foram coletados para realização da avaliação fisiológica (15 peixes por tratamento) e parasitológica (30 peixes por tratamento).

Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados diariamente durante o experimento, e os valores médios registrados foram: oxigênio dissolvido 5,03 ± 0,4 mg L<sup>-1</sup>, temperatura 29,9 ± 1,9 °C (YSI Pro20, YSI Inc., USA) e pH 6,6 ± 0,3 (YSI F-1100, YSI Inc.,

USA). A alcalinidade ( $111,76 \pm 32,21 \text{ mg L}^{-1}$ ) e amônia total ( $0,346 \pm 0,77 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram determinados pelos métodos de titulação e endofenol, respectivamente (APHA,1992).

#### 2.4. Variáveis hematológicas, bioquímicas e enzimáticas

Após os banhos terapêuticos, o sangue dos peixes foi coletado por punção da veia caudal com seringas heparinizadas, sendo determinado o hematócrito (Hct) pelo método de microhematócrito com a leitura do percentual de sedimentação em escala padronizada, a hemoglobina (Hb) pelo método da cianometemoglobina segundo Collier, (1944) e a contagem de eritrócitos (RBC), após diluição do sangue em solução de formol citrato, com uso de câmara de Neubauer, sob microscópio óptico (Natt e Herrick, 1952). Com bases nesses dados, o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) foram determinados (Ranzani-Paiva et al., 2013). Quanto às variáveis bioquímicas, determinou-se os níveis de glicose plasmática (GP) pelo método da glicose oxidase e proteínas totais (PT) pelo método de biureto, com emprego de kits comerciais específicos (Labtest®, Minas Gerais, Brasil), além das variáveis enzimáticas como a atividade da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT) no plasma por kit em modo cinético, enquanto a fosfatase alcalina (ALP) foi determinada com uso de kit colorimétrico (LabTest®, Minas Gerais, Brasil).

#### 2.5. Análise parasitológica e eficácia dos óleos essenciais

Após a coleta de sangue, os peixes pertencentes aos diferentes tratamentos (n=30) foram eutanasiados por perfuração craniana, sendo as brânquias coletadas e fixadas em formol 5%. A contagem de *P. pillulare* foi feita em câmara de Sedgewick Rafter, com auxílio de microscópio óptico, conforme descrito por Maciel et al. (2018). Com esses resultados foram calculados os índices parasitários de prevalência, intensidade média e abundância média da infestação, de acordo Bush et al. (1997). A eficácia dos banhos terapêuticos com os OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* foi calculada de acordo com a recomendações de Dotta et al. (2015).

#### 2.6. Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade da variância pelo teste de Levene. Dados não normais foram logaritimizados (log natural). Análise de variância (one-way ANOVA), seguida por teste de Tukey foram aplicados para dados paramétricos ou análise de Kruskal-Wallis seguida por teste de Dunn, quando não verificada a normalidade dos dados. O nível de significância utilizado em todos

os testes foi de 95% ( $p$ -value  $\geq 0.05$ ). Para isso, utilizou-se o Software R estatística versão 4.0.2.

### 3. Resultados

A composição química dos óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* está apresentada na Tabela 1. Os constituintes majoritários do OE de *A. triphylla* foram  $\beta$ -pineno (22,1%), trans-pinocanfona (13,1%) e acetato de trans-pinocarvila (7,6%). Para o OE de *L. gracilis* detectou-se carvacrol (42,2%), *p*-cimeno (11,2%) e  $\gamma$ -terpineno (10,7%), enquanto para o OE de *P. aduncum* foi observado dilapiol (80,7%), (*E*)-cariofileno (4,6%) e miristicina (2,9%) (Tabela 1).

Neste estudo, os tambaquis apresentaram prevalência de 100% para *P. pillulare* com intensidade média e abundância média variando de  $9706,7 \pm 3061,6$  a  $1440,0 \pm 904,4$  (Tabela 2). Com relação aos valores de intensidade e abundância média, observou-se um aumento significativo nesses índices no tratamento controle comparado aos demais tratamentos com óleo essencial, entretanto não houve diferença significativa entre os tratamentos com OE (Tabela 2).

Com relação a eficácia dos banhos terapêuticos, com os OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum*, observou-se que os valores variaram de 63,8 a 83,8% (Figura 1). Os maiores valores de eficácia foram obtidos com os tratamentos empregando o OE de *P. aduncum*, com valores de eficácia de 80,7 e 83,8% empregando as concentrações de 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 1). Não foram observadas mortalidades durante ou após a aplicação dos banhos terapêuticos com os óleos essenciais avaliados.

Com relação aos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com óleos essenciais e o grupo controle (Tabela 3). Com relação aos parâmetros enzimáticos, somente para a (ALT) observou-se uma redução significativa ( $p > 0,05$ ) nos valores desta enzima nos tratamentos com os OEs de *P. aduncum* (10 e 20 mg L<sup>-1</sup>) e *A. triphylla* (40 e 50 mg L<sup>-1</sup>), em comparação ao tratamento com OE de *L. gracilis* (20 e 30 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 3).

### 4. Discussão

Alternativas naturais para o tratamento de doenças parasitárias e bacterianas em peixes estão sendo priorizadas para promoção da aquicultura sustentável (Tavares-Dias, 2018; Zhu, 2020; Dawood et al., 2021). Dentre os produtos vegetais, os óleos essenciais das espécies *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* vêm sendo estudados quanto à atividade antiparasitária em diferentes espécies peixes (Corral et al., 2018; Tavares-Dias, 2018; Barriga et al., 2020;

Oliveira et al., 2021). É importante destacar que a atividade antiparasitária destes OEs é atribuída aos seus compostos bioativos, a exemplo dos compostos majoritários  $\beta$ -pineno, trans-pinocanfona e acetato de trans-pinocarvila no OE de *A. triphylla*, carvacrol, *p*-cimeno e  $\gamma$ -terpineno no OE de *L. gracilis* e dilapiol, (*E*)-cariofileno e miristicina no OE de *P. aduncum*. Em outros estudos, observou-se para as espécies *L. gracilis* e *P. aduncum* composição química semelhante, com variação apenas no percentual dos compostos (Corral et al., 2018; Barriga et al., 2020; Miura et al., 2021), já para o OE de *A. triphylla* foi observada diferença tanto nos constituintes quanto no percentual dos compostos (Santos et al., 2017; Bandeira-Junior et al., 2018), e esta variação na composição dos OEs é explicada por fatores edafoclimáticos e ambientais, que têm grande influência na biossíntese dos metabólitos secundários (Tavares-Dias, 2018).

Com o uso de óleos essenciais para o controle de protozoários em peixes nativos do Brasil há poucos dados disponíveis na literatura, e para o dinoflagelado *P. pillulare* é ainda mais restrito (Tavares-Dias, 2018; Dawood et al., 2021). Ferreira et al. (2019) observaram uma redução significativa na intensidade parasitária deste parasito em tambaqui, após aplicação de banhos terapêuticos com OE de *Mentha piperita*. Esses autores encontraram eficácia de 79,9% no muco e 54,6% nas brânquias de tambaqui, com emprego de banhos com 40 mg L<sup>-1</sup> do OE de *M. piperita*, que tem o mentol como composto majoritário deste OE, o qual também apresenta atividade anestésica (Brandão et al., 2021). Redução da intensidade parasitária de *P. pillulare* nas brânquias de tambaqui também foi observada no presente estudo, mas com emprego dos OEs de *L. gracilis*, *A. triphylla* e *P. aduncum* (intensidade média variando de 3.326,7 a 1.440,0), com os maiores valores de eficácia antiparasitária (65,8%, 78,4% e 83,3%) observados com o emprego dos OEs de *L. gracilis* (30 mg L<sup>-1</sup>), *A. triphylla* (50 mg L<sup>-1</sup>) e *P. aduncum* (20 mg L<sup>-1</sup>), respectivamente, em protocolo de banhos terapêuticos de 15 minutos por 3 dias consecutivos. Destaca-se que a ação dos OEs causa ruptura da membrana e extravazamento do conteúdo citoplasmático das células dos parasitos, devido à hidrofobicidade e permeabilidade celular, levando à alteração da morfologia celular e cessação da atividade parasitária (Dawood et al., 2021).

Estudos mostram que certos OEs podem reduzir significativamente a intensidade de outras espécies de protozoários em peixes, a exemplo do OE de *Melaleuca alternifolia* que na concentração de 50  $\mu$ L L<sup>-1</sup>, quando aplicado em banhos terapêuticos por duas horas em cinco dias consecutivos, reduziu 99,80% na pele e 98,80% nas brânquias a infestação pelo *I. multifiliis* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Valladão et al., 2016). Com a aplicação do mesmo OE e concentração para *I. multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*), os autores relataram eficácia de

94,87%, em banhos de 1 hora por 4 dias, cujos constituintes majoritários deste OE foram terpineno-4-ol (27,15%),  $\gamma$ -terpineno (24,08%) e  $\alpha$ -terpineno (9,65%) (Baldissera et al., 2017). Estes mesmos compostos também foram registrados neste estudo com OE de *L. gracilis*, porém em menores percentuais. Outros compostos observados nos OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* no presente estudo foram germacreno D, biciclogermacreno, *E*-cariofileno e óxido cariofileno, os quais também foram registrados no OE de *Varronia curassavica*, que promoveu redução de 30% dos trofontes do protozoário *I. multifiliis* em tambaquis, em banho de 1 hora nas concentrações de 0,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, e a ação deste OE foi confirmada pelos danos à membrana plasmática do protozoário, conforme relatado por Nizio et al. (2018). Portanto, esses resultados reforçam o potencial dos OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* e de seus constituintes químicos para o controle de protozoários em peixes, como o dinoflagelado *P. pillulare* nas brânquias de tambaqui.

Para outros parasitos de peixes também foi relatada a eficácia dos óleos essenciais/extratos das plantas avaliadas neste estudo. Queiroz (2012) relataram que o extrato aquoso de *P. aduncum* apresentou eficácia acima de 80% para helmintos monogenoides de pirarucu (*Arapaima gigas*). O OE de *P. aduncum* apresentou eficácia de 76,21% após administração oral de 64 mL kg<sup>-1</sup> por 15 dias no controle do nematoide *Hysterothylacium* sp. em pirarucu (Corral et al., 2018). Oliveira et al. (2021) relataram que os OEs de *P. aduncum*, *A. triphylla* e *L. gracilis* apresentam eficácia anti-helmíntica *in vitro* contra o acantocéfalos *N. buttnerae* de tambaqui. Com emprego do OE de *L. grata*, heterotípico de *L. gracilis*, em banhos terapêuticos na concentração de 700 mg L<sup>-1</sup> por 30 min, foi relatada eficácia de 95,1% no controle de monogenea (*Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium boegeri* e *Linguadactyloides brinkmanni*) em tambaquis (Barriga et al., 2020). É importante destacar a forte atividade antiparasitária destes OEs para diferentes grupos de parasitos, os quais constituem fonte sustentável para a elaboração de bioprodutos para controle de parasitoses que acometem os peixes de cultivo.

Neste estudo, os parâmetros hematológicos não foram afetados pela aplicação dos banhos terapêuticos com os OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum*, observado pelos baixos valores de hematócrito e hemoglobina, mas sim pela infecção dos peixes pelo dinoflagelado *P. pillulare*, cuja intensidade média inicial foi de 18.600. Estes parâmetros estão relacionados à capacidade de transporte de oxigênio, e sua redução em peixes parasitados pode também ser indicativo de uma condição de anemia (Tavares-Dias, 2015). Esses resultados são reforçados pelo modo de ação do *P. pillulare*, que se fixa às células do hospedeiro através de prolongamentos em forma de raiz, os rizocistos, e podem causar hemorragias no tegumento dos peixes,

além de provocar hiperplasia e fusão das lamelas secundárias, promovendo graves problemas respiratórios (Martins et al., 2001; Tavares-Dias et al., 2021c). A redução nos valores de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos já foram registrados em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) infestados pelo protozoário *I. multifiliis* (Tavares-Dias et al., 2002; Azimzadeh, 2016). Já Soares et al. (2016) relataram que altas concentrações do OE de *Lippia alba* (100 e 150 mg L<sup>-1</sup>) em banhos terapêuticos de 30 min promoveram alterações nos parâmetros sanguíneos, como aumento nos níveis de trombócitos, linfócitos, eosinófilos e número de neutrófilos, além de redução na intensidade do protozoário *I. multifiliis* em tambaqui (40,7% e 50,3%).

Os parâmetros bioquímicos, como glicose plasmática e proteínas totais não diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com os OEs, apesar de apresentarem valores moderadamente aumentados em relação ao controle. Destaca-se que o aumento dos valores de glicose são indicativos de uma condição de estresse, que pode ser do manejo decorrente da aplicação de três banhos consecutivos e/ou da infestação por *P. pillulare*. Não é sugerido que o estresse tenha sido causado pelas concentrações de OE neste estudo, já que as concentrações dos OEs utilizadas neste estudo foram bem inferiores à da concentração média letal estabelecida para o tambaqui (Santos, 2021).

Alguns autores relataram redução nos níveis plasmáticos das enzimas (AST) e (ALT) como efeito promotor da atividade hepática, em resposta à inclusão de produtos naturais na dieta de peixes (Karata et al., 2020; Yousefi et al., 2020). Essa resposta foi observada no presente estudo para a atividade da ALT, nos peixes com redução nos valores desta enzima nos peixes parasitados com *P. pillulare* e tratados com OE de *P. aduncum* e *A. triphylla*, indicando que estes OEs têm efeito hepatoprotetor. De forma semelhante, com emprego do OE de gengibre (*Zingiber officinale*) na dieta da dourada (*Sparidentex hasta*), os níveis plasmáticos de ALT e AST diminuíram com dieta combinando 10 g kg<sup>-1</sup> de gengibre, 10 g kg<sup>-1</sup> de alho (*Allium sativum*) e 10 g kg<sup>-1</sup> de tomilho (*Thymus vulgaris*), indicando melhora na saúde do fígado (Jahanjoo et al., 2018). Destaca-se que a ALT é uma enzima indicadora de dano da função hepática e está relacionada ao metabolismo de proteínas, podendo sofrer alterações em decorrência de toxicidade de produtos ou exposição à patógenos (Slavík et al., 2017; Yousefi et al., 2020). Neste estudo, apesar do aumento significativo da ALT nos tratamentos com OE de *L. gracilis* (20 e 30 mg L<sup>-1</sup>) em relação aos demais tratamentos, considera-se que este aumento não é indicativo de danos graves ao fígado de tambaquis infectados por *P. pillulare*, pois em tambaquis saudáveis a variação nos valores médios de ALT foi de 26,83 a 40,1 U L<sup>-1</sup>

(Souza, 2019). Portanto, a aplicação de banhos com os OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* não comprometeram a função hepática em tambaqui do presente estudo.

## 5. Conclusão

Os OEs de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* apresentaram atividade antiprotozoária em tambaqui, com eficácia entre 63,8% e 83,8%. A infestação por *Piscinoodinium pillulare* promoveu alterações moderadas nos parâmetros sanguíneos, e os banhos terapêuticos de 15 min, por três dias consecutivos, com os óleos essenciais não comprometeram a função hepática nos peixes. Portanto, os OEs de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum*, nas concentrações de 40, 50, 20, 30, 10 e 20mg/L<sup>-1</sup> respectivamente, são indicados para o tratamento de tambaquis infestados por *P. pillulare*.

## Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (10.19.00.038.00.00) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas - Fapeam (Edital 002/2018, Universal Amazonas) pelo apoio financeiro. Ao pesquisador Roger Crescêncio e ao assistente José Marconde da Costa e Silva, da Embrapa Amazônia Ocidental, e às bolsistas Ana Silva, Tamires Rocha, Alexia Ribeiro e Nilce Ellen dos Santos pelo auxílio na aquisição e coleta de material biológico dos peixes.

## Referências

- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION), 1992. Standard methods for the examination of water and waster. 18ed. Washington, DC: American Public Health Association, p.1050.
- Arbildo-Ortiz, H., Alvez-Robledo, J., Guardia, C.C, Souza, A.K.S., 2020. Primer registro de infestación de *Piscinoodinium pillulare* (Dinoflagellida) en juveniles de *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) en cultivo semi-intensivo en Loreto, Perú. Rev. Inv. Vet. Perú 31, 1–7.
- Azimzadeh, K., 2016. Comparative studies of some haematological and serological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*, 1792) with ichthyophthiriasis. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 16(3), 611-621.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Moreira, K.L., Rocha, M.I.U., Veiga, M.L., Baldisserotto, B., 2017. *Melaleuca alternifolia* essential oil prevents oxidative stress and ameliorates the

- antioxidant system in the liver of silver catfish (*Rhamdia quelen*) naturally infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Aquaculture* 480, 11-16.
- Bandeira-Junior, G., Abreu, M.S., Rosa, J.G.S., Pinheiro, C.G., Heinzmann, B.M., Caron, B.O., Barcellos, L.J.G., 2018. *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* essential oils are anxiolytic without inducing aversiveness in fish. *Aquaculture* 482, 49-56.
- Barriga, I.B., Gonzales, A.P.P.F., Brasiliense, A.R.P., Castro, K.N.C., Tavares-Dias, M., 2020. Essential oil of *Lippia grata* (Verbenaceae) is effective in the control of monogenean infections in *Colossoma macropomum* gills, a large Serrasalminidae fish from Amazon. *Aquac. Res.* 51, 3804-3812.
- Brandão, F.R., Farias, C.F.S., Souza, D.C.M., Oliveira, M.I.B., Matos, L.V., Majolo, C., Oliveira, M.R., Chaves, F.C.M., O'sullivan, F.L.A., Chagas, E.C., 2021. Anesthetic potential of the essential oils of *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* for *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 534, 736275.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575–583.
- Collier, H. B., 1944. Standardization of blood hemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, 50 (6), 550.
- Chagas, E.C., Aquino-Pereira, S.L., Benavides, M.V., Brandão, F.R., Monteiro, P.C., Maciel, P.O., 2019. *Neoechinorhynchus buttnerae* parasitic infection in tambaqui (*Colossoma macropomum*) on fish farms in the state of Amazonas. *Bol. Inst. Pesca* 45, e499.
- Corral, A.C.T., Queiroz, M.N., Andrade-Porto, S.M., Morey, G.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.
- Dawood, M.A.O., Basuini, M.F.E., Zaineldin, A.I., Yilmaz, S., Hasan, M.T., Ahmadifar, E., Asely, A.M.E., Abdel-Latif, H.M.R., Alagawany, M., Abu-Elala, N.M., Doan, H.V., Sewilam, H., 2021. Antiparasitic and antibacterial functionality of essential oils: an alternative approach for sustainable aquaculture. *Pathogens*, 10, 185.
- Dotta, G., Brum, A., Jeronimo, G. T., Maraschin, M., Martins, M. L., 2015. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24, 66-71.
- Ferreira, L.C., Cruz, M.G., Lima, T.B.C., Serra, B.N.V., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Ventura, A.S., Jerônimo, G.T., 2019. Antiparasitic activity of *Mentha piperita*



- (Lamiaceae) essential oil against *Piscinoodinium pillulare* and its physiological effects on *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture* 512, 734-343.
- Ferreira-Júnior, J.A., Sousa, E.M., Araújo, D.P., Macêdo, J.T.S.A., Pedroso, P.M.O., 2018. Surto de infecção por *Piscinoodinium pillulare* e *Trichodina* spp. em tambaquis (*Colossoma macropomum*), pirapitingas (*Piaractus brachypomus*) e tilápias (*Oreochromis niloticus*) no Distrito Federal. *Act. Scient. Vet.* 46, 293.
- Fujimoto, R.Y., Hide, D.M.V., Paixão, P.E.G., Abe, H.A., Dias, J.A.R., Sousa, N.C., Couto, M.V.S., Silva, R.V.B. Madi, R.R., Benavides M.V., Ishikawa, M.M., Chagas, E.C., Boijink, C.L., Dompieri, M.H.G., Pereira, A.M.L., Maciel, P.O., 2019. Fauna parasitária e relação parasito-hospedeiro de tambaquis criados na região do Baixo São Francisco, nordeste do Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 71, 563–570.
- Gomes, A.L.S., Costa, J.I., Benetton, M.L.F.N., Bernardino, G., Belem-Costa, A., 2018. A fast and practical method for initial diagnosis of *Piscinoodinium pillulare*. *Cienc. Rural*, 48, 7, e20170680.
- Jahanjoo, V., Yahyavi, M., Akrami, R., Bahri, A. H., 2018. Influence of Adding Garlic (*Allium sativum*), Ginger (*Zingiber officinale*), Thyme (*Thymus vulgaris*) and Their Combination on the Growth Performance, Haematoimmunological Parameters and Disease Resistance to *Photobacterium damsela* in Sobaity Sea Bream (*Sparidentex hasta*) Fry. *Turkish J. Fish. Aquatic. Sciences*, 18, 633-645.
- Karataş, T., Korkmaz, F., Karataş, A., Yildirim, S., 2020. Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on growth, blood biochemistry, immunity, antioxidant, digestive enzymes and liver histopathology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquac. Nutrit.* 26, 1533-1541.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª ed. Nova Odessa: Editora Instituto Plantarum. 544 p.
- Maciel, P.O., Garcia, F., Chagas, E.C., Fujimoto, R.Y., Tavares-Dias, M., 2018. Trichodinidae in commercial fish in South America. *Rev. Fish. Biol. Fisheries*, 28, 33–56.
- Marchiori, N.C., Martins, M.L., 2013. Flagelata. In: Pavanelli, G.C., Takemoto, R.C., Eiras, J.C., (Eds.). *Parasitologia: peixes de água doce do Brasil*. Maringá: Eduem, 201-232.
- Martins, M. L., Cardoso, L., Marchiori, N., Pádua, S.B., 2015. Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. *Ver. Bras. Parasitol. Vet.* 24, 1–20.
- Martins, M.L., Moraes, J.R.E., Andrade, P.M., Schalch, S.H.C., Moraes, F.R.D., 2001. *Piscinoodinium pillulare* (Schäperclaus, 1954) Lom, 1981 (Dinoflagellida) Infection in

- cultivated freshwater fish from the Northeast Region of São Paulo State, BRAZIL. Parasitological and pathological aspects. *Braz. J. Biol.* 61, 639-644.
- Martins, M.L., Mourino, J.L., Chagas, E.C., Silva, B.C., Fujimoto, R.Y., Pádua, S.B., 2017. Ectoparasitários na aquicultura. In: Baldisserotto, B., Gomes, L.C., Heinzmann, B., Cunha, M.A., (Eds.). *Farmacologia aplicada à aquicultura*. Santa Maria: UFSM, 127-182.
- Menezes, J.O., Couto, M.V., Sousa, N.C., Cunha, F.S., Abe, H.A., Ramos, F., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., Maria, A.N., Carneiro, P.C.F., Fujimoto, R.Y., 2018. Efficacy of *Ocimum gratissimum* essential oil against the monogenean *Cichlidogyrus tilapiae* gill parasite of Nile tilapia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo*, 70, 497-504.
- Miura, P.T., Queiroz, S.C.N., Jonsson, C.M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Reyes, F.G., 2021. Study of the chemical composition and ecotoxicological evaluation of essential oils in with potential use in aquaculture. *Aquac. Res.* 52, 3415-3424.
- Natt, M. P., & Herrick, C. A., 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*, 31(4), 735–738.
- Nizio, D.A.C., Fujimoto, R.Y., Maria, A.N., Carneiro, P.C.F., França, C.C.S., Sousa, N.C., Brito, F.A., Sampaio, T.S., Arrigoni-Blank, M.F., Blank, A.F., 2018. Essential oils of *Varronia curassavica* accessions have different activity against white spot disease in freshwater fish. *Parasitol. Res.* 117, 97–105.
- Oliveira, M.I.B, Brandão, F.R., Silva, M.J.R., Rosa, M.C., Farias, C.F.S, Santos, D.S., Majolo, C., Oliveira, M.R., Chaves, F.C.M, Bizzo, H.R., Tavares-Dias, M., Chagas, E.C., 2021. In vitro anthelmintic efficacy of essential oils in the control of *Neoechinorhynchus buttnerae*, an endoparasite of *Colossoma macropomum*. *J. Essent. Oil Res.* 33, 1-14.
- PEIXE BR - Anuário brasileiro de piscicultura. 2021. 71p. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuariopeixe-br-da-piscicultura-2021/>>. Acessado em 09 de setembro de 2021.
- Queiroz, M.N., 2012. Efeito do extrato aquoso da *Piper aduncum* L no controle de parasitas monogenéticos (Platyhelminthes: Monogenoidea) e parâmetros fisiológicos do pirarucu *Arapaima gigas* (SCHINZ 1822). UniNilton Lins, Brazil. 83p. (Dissertação de mestrado).
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM.
- Saint-Paul, U., 2017. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. *Acta Fish. Aquat. Res.* 5(1), 1-9.
- Sant'Ana, F.J., Oliveira, S.L., Rabelo, R.E., Vulcani, V.A., Silva, S.M., Júnior, J.A.F., 2012. Surtos de infecção por *Piscinoodinium pillulare* e *Henneguya* spp. em pacus (*Piaractus*

- mesopotamicus*) criados intensivamente no Sudoeste de Goiás. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 121-125.
- Santos, A.C., Sutili, F.J., Heinzmann, B.M., Cunha, M.A., Brusque, I.C., Baldisserotto, B., Zeppenfeld, C.C., 2017. *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: Blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish of ShellFish Immunol.* 62, 213–216.
- Slavík, O., Horký, P., Douda, K., Velíšek, J., Kolářová, J., Lepič, P., 2017. Parasite-induced increases in the energy costs of movement of host freshwater fish. *Physiol. Behav.* 171, 127-134.
- Soares, B.V., Neves, L.R., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Dias, M.K.R., Chagas, E.C., Tavares-Dias, M., 2016. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture* 452, 107–114.
- Souza, D.C.M., 2019. Avaliação da resposta imune humoral de tambaqui *Colossoma macropomum* infectado pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras Nos Trópicos) - Universidade Federal do Amazonas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, 98p.
- Tavares-Dias, M., 2015. Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados. In *Aquicultura no Brasil: Novas perspectivas* (1 st edition, Vol. 1). São Carlos, SP, Brazil: Pedro & João Editores.
- Tavares-Dias, M., 2018. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites: Review. *Aquat. Living Resour.* 31, 13.
- Tavares-Dias, M., 2021. Toxic, physiological, histomorphological, growth performance and antiparasitic effects of copper sulphate in fish aquaculture. *Aquaculture* 535, 736350.
- Tavares-Dias, M., 2021. Toxicity, physiological, histopathological and antiparasitic effects of the formalin, a chemotherapeutic of fish aquaculture. *Aquac. Res.* 52, 1803-1823.
- Tavares-Dias, M., Chagas, E.C., Maciel, P.M., 2021. Parasitismo e seus efeitos sanguíneos e histopatológicos em peixes. In: Bruno Olivetti de Mattos; Jackson Pantoja-Lima; Adriano Teixeira de Oliveira; Paulo Henrique Rocha Aride. (Org.). *Aquicultura na Amazônia: estudos técnico-científicos e difusão de tecnologias*. 1ed. Ponta Grossa: Atena, 294-310.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., Martins, M.L., Santana, A.E., 2002. Haematological changes in *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. *Bol. Inst. Pesca*, 8, 1-9.

- Valenti, W.C., Barros, H.P., Moraes-Valenti, P., Bueno, G.W., Cavalli, R.O., 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquac. Rep.* 19, 100611.
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Ikefuti, C.V., Cruz, C., Levy-Pereira, N., Rodrigues, M.V.N., Pilarski, F., 2016. Essential oils to control *ichthyophthiriasis* in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *J.Fish Diseases.* 39, 1143–1152.
- Yousefi, M., Vatnikov, Y.A., Kulikov, E.V., Plushikov, V.G., Drukovsky, S.G., Hoseinifar, S.H., Doan, H.V., 2020. The protective effects of dietary garlic on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient ammonia toxicity. *Aquaculture*, 526, 735400.
- Zhu, F., 2020. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture* 526, 735422.

## FIGURAS E TABELAS

**Tabela 1.** Principais compostos majoritários dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum*.

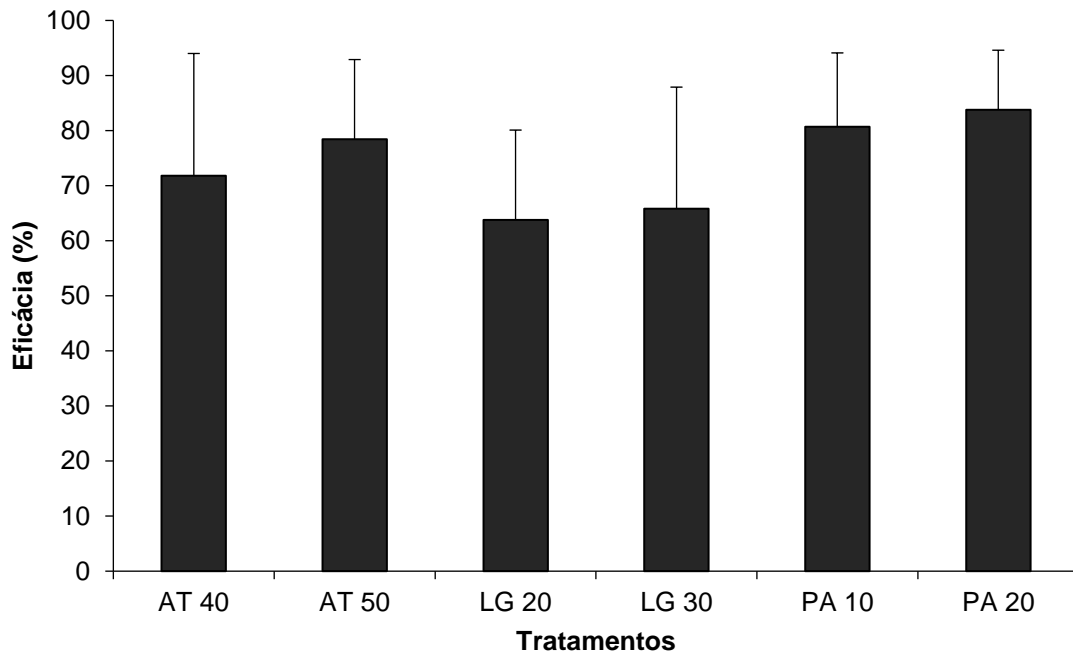
<i>Aloysia triphylla</i>			<i>Lippia gracilis</i>			<i>Piper aduncum</i>		
Compostos	%	IR	Compostos	%	IR	Compostos	%	IR
$\beta$ -pineno	22,1	975	carvacrol	42,2	1302	dilapiol	80,7	1629
trans-pinocanfona	13,1	1157	<i>p</i> -cimeno	11,2	1022	( <i>E</i> )-cariofileno	4,6	1414
acetato de trans-pinocarvila	7,6	1283	$\gamma$ -terpineno	10,7	1055	miristicina	2,9	1519
guaíol	5,3	1593	timol, metil-éter	6,1	1232	$\beta$ -pineno	2,4	975
cis-pinocanfona	4,9	1170	( <i>E</i> )-cariofileno	5,1	1414	$\alpha$ -pineno	1,1	931
trans-pinocarveol	3,7	1135	biciclogermacreno	5,0	1491	óxido de cariofileno	1,1	1577
$\alpha$ -pineno	3,1	931	timol	3,5	1292	viridiflorol	1,0	1586
óxido de cariofileno	3,0	1577	$\alpha$ -terpineno	2,1	1015	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno	0,8	1045
limoneno	2,9	1026	1,8-cineol	1,4	1028	$\alpha$ -humuleno	0,7	1448
( <i>E</i> )-cariofileno	2,9	1414	aromadendreno	1,4	1433	biciclogermacreno	0,7	1491
mirreno	2,9	989	$\alpha$ -tujeno	1,3	924	( <i>E</i> )-nerolidol	0,6	1561
mirtenol	2,5	1193	$\alpha$ -humuleno	1,2	1448	espatulenol	0,5	1572
pinocarvona	2,2	1159	limoneno	0,8	1026	( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno	0,4	1034
germacreno D	2,0	1476	terpinen-4-ol	0,7	1174	limoneno	0,3	1026
germacreno B	2,2	1551	globulol	0,7	1577	$\delta$ -amorfenol	0,3	1502

IR: Índice de Retenção.

**Tabela 2.** Índices parasitários de prevalência, intensidade média e abundância média de *Piscinoodinium pillulare* nas brânquias de tambaqui (*Colossoma macropomum*), após banhos terapêuticos com os óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum*.

Índices parasitários	Tratamentos						
	Controle	<i>A. triphylla</i> 40 mg L <sup>-1</sup>	<i>A. triphylla</i> 50 mg L <sup>-1</sup>	<i>L. gracilis</i> 20 mg L <sup>-1</sup>	<i>L. gracilis</i> 30 mg L <sup>-1</sup>	<i>P. aduncum</i> 10 mg L <sup>-1</sup>	<i>P. aduncum</i> 20 mg L <sup>-1</sup>
Prevalência	100	100	100	100	100	100	100
Intensidade média	9706,7±3061,6a	2296,7±938,4b	2140,0±1737,7b	3326,7±1489,2b	2916,7±1038,6b	1693,3±1068,4b	1440,0±904,4b
Abundância média	9706,7±3061,6a	2296,7±938,4b	2140,0±1737,7b	3326,7±1489,2b	2916,7±1038,6b	1693,3±1068,4b	1440,0±904,4b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Teste de Dunn,  $p > 0,05$ ).



**Figura 1.** Eficácia antiprotozoária dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* no controle de *Piscinoodinium pillulare* em tambaqui (*Colossoma macropomum*). Tratamentos: AT 40 e AT 50 – *A. triphylla* 40 e 50 mg L<sup>-1</sup>, LG 20 e LG 30 - *L. gracilis* 20 e 30 mg L<sup>-1</sup>, PA 10 e PA 20 - *P. aduncum* 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela 3.** Valores médios dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e enzimáticos de *Colossoma macropomum* infestado por *Piscinoodinium pillulare*, após banhos terapêuticos com óleo essencial de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum*.

Parâmetros	Tratamentos						
	Controle	<i>A. triphylla</i> 40 mg L <sup>-1</sup>	<i>A. triphylla</i> 50 mg L <sup>-1</sup>	<i>L. gracilis</i> 20 mg L <sup>-1</sup>	<i>L. gracilis</i> 30 mg L <sup>-1</sup>	<i>P. aduncum</i> 10 mg L <sup>-1</sup>	<i>P. aduncum</i> 20 mg L <sup>-1</sup>
Hematócrito (%)	27,4±5,9 <sup>a</sup>	28,2±2,9 <sup>a</sup>	28,2±3,3 <sup>a</sup>	29,1±4,0 <sup>a</sup>	27,8±2,7 <sup>a</sup>	25,8±1,4 <sup>a</sup>	28,4±4,4 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	7,3±1,0 <sup>a</sup>	6,7±1,2 <sup>a</sup>	6,7±1,2 <sup>a</sup>	6,7±1,3 <sup>a</sup>	7,1±1,5 <sup>a</sup>	6,7±0,9 <sup>a</sup>	7,3±1,4 <sup>a</sup>
RBC (10 <sup>-6</sup> µL <sup>-1</sup> )	1,0±0,4 <sup>a</sup>	1,0±0,3 <sup>a</sup>	1,0±0,4 <sup>a</sup>	1,1±0,4 <sup>a</sup>	1,0±0,4 <sup>a</sup>	1,1±0,6 <sup>a</sup>	1,3±0,4 <sup>a</sup>
VCM (fL)	211,2±48,4 <sup>a</sup>	322,9±120,3 <sup>a</sup>	295,3±93,0 <sup>a</sup>	285,6±93,6 <sup>a</sup>	270,1±93,9 <sup>a</sup>	230,3±38,2 <sup>a</sup>	228,9±121,14 <sup>a</sup>
CHCM (%)	30,5±9,6 <sup>a</sup>	24,2±6,0 <sup>a</sup>	23,6±4,0 <sup>a</sup>	23,7±6,0 <sup>a</sup>	25,3±5,8 <sup>a</sup>	26,1±4,3 <sup>a</sup>	38,5±35,7 <sup>a</sup>
Glicose (mg dL <sup>-1</sup> )	116,7±54,9 <sup>a</sup>	152,5±83,9 <sup>a</sup>	131,0±50,7 <sup>a</sup>	118,5±42,9 <sup>a</sup>	160,1±39,8 <sup>a</sup>	113,9±45,5 <sup>a</sup>	107,1±39,8 <sup>a</sup>
Proteínas totais (g dL <sup>-1</sup> )	8,4±5,9 <sup>a</sup>	10,1±7,9 <sup>a</sup>	6,1±4,1 <sup>a</sup>	7,1±4,3 <sup>a</sup>	5,6±3,5 <sup>a</sup>	8,3±6,8 <sup>a</sup>	9,4±5,1 <sup>a</sup>
FFA (U L <sup>-1</sup> )	26,6±18,2 <sup>a</sup>	34,8±45,5 <sup>a</sup>	28,8±17,8 <sup>a</sup>	33,8±16,5 <sup>a</sup>	27,1±17,5 <sup>a</sup>	33,2±17,2 <sup>a</sup>	20,4±13,2 <sup>a</sup>
ALT (U L <sup>-1</sup> )	21,9±9,8 <sup>abc</sup>	17,9±13,8 <sup>ac</sup>	20,0±22,5 <sup>ac</sup>	30,3±13,5 <sup>b</sup>	31,1±15,8 <sup>db</sup>	22,3±21,1 <sup>ac</sup>	15,2±10,5 <sup>c</sup>
AST (U L <sup>-1</sup> )	37,5±12,1 <sup>a</sup>	41,2±22,9 <sup>a</sup>	43,2±16,9 <sup>a</sup>	47,0±30,2 <sup>a</sup>	51,6±34,9 <sup>a</sup>	41,9±12,2 <sup>a</sup>	48,5±20,8 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Dunn ( $p > 0,05$ ). RBC = número de eritrócitos, VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, FFA = fosfatase alcalina, ALT = alanina aminotransferase, AST = aspartato aminotransferase.



## CONCLUSÕES GERAIS

O uso de óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia gracilis* e *Piper aduncum* mostrou-se com uma alternativa natural para o controle da doença parasitária causada por *Piscinoodinium pillulare* em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Dentre os resultados positivos obtidos, destaca-se o estabelecimento de concentrações seguras dos três óleos essenciais avaliados, através dos testes de toxicidade aguda, para aplicação em protocolos de banhos terapêuticos para o tratamento de doenças na piscicultura. A concentração letal média (CL<sub>50-4 h</sub>) estimada para o óleo essencial de *A. triphylla* foi de 109,57 mg L<sup>-1</sup>, para *L. gracilis* foi de 41,63 mg L<sup>-1</sup> e para *P. aduncum* foi de 48,17 mg L<sup>-1</sup>. Contudo, concentrações altas dos óleos essenciais foram responsáveis por promoverem danos histopatológicos de grau II, em baixa frequência, que incluem danos severos e que podem comprometer o funcionamento das brânquias, que é o órgão responsável pelas trocas gasosas e iônicas nos peixes, mas que são reparáveis se as condições adversas forem controladas, já os danos de grau III, que incluem as alterações severas e irreversíveis, como a necrose, foram observadas com emprego do óleo essencial de *P. aduncum*, em concentrações a partir de 47,5 mg L<sup>-1</sup>. Estes resultados indicam que concentrações dos óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* abaixo da CL<sub>50-4 h</sub> podem ser aplicadas com segurança em protocolos de banhos terapêuticos de curta duração para o controle do dinoflagelado *P. pillulare*. Em relação à atividade antiparasitária, a aplicação de três banhos terapêuticos de 15 minutos com os óleos essenciais de *A. triphylla* (40 e 50 mg L<sup>-1</sup>), *L. gracilis* (20 e 30 mg L<sup>-1</sup>) e *P. aduncum* (10 e 20 mg L<sup>-1</sup>), em concentrações inferiores a CL<sub>50</sub>, promoveram a sobrevivência dos peixes e apresentaram alta eficácia no controle de *P. pillulare* em tambaquis, cujos valores de eficácia variaram de 63,8 a 83,8%. De acordo com as análises fisiológicas, os óleos essenciais se mostraram como um produto seguro para uso, pois não promoveram diferenças significativas nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e enzimáticos dos tambaquis, com exceção da enzima alanina aminotransferase que aumentou nos tratamentos com *L. gracilis* (20 e 30 mg L<sup>-1</sup>), mas apesar disso esses valores foram próximos aos valores registrados para tambaquis sadios, o que permite inferir que não há comprometimento da função hepática nos tambaquis. Por outro lado, a infecção dos peixes pelo dinoflagelado *P. pillulare* foi responsável pelos baixos valores de hematócrito e hemoglobina, que pode ser decorrente do modo de ação do parasito, que se fixa às células do hospedeiro através dos rizocistos e podem causar hemorragias no tegumento dos peixes, hiperplasia e fusão das lamelas, com implicação em problemas respiratórios, e isso reforça a importância da aplicação dos tratamentos terapêuticos com os óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P.*

*aduncum* para o controle deste parasito que é reconhecido mundialmente pelos surtos provocados em grande escala nas pisciculturas comerciais.

Os óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. gracilis* e *P. aduncum* nas concentrações testadas neste estudo constituem boas alternativas terapêuticas para mitigar os impactos negativos causados pela infestação de *P. pillulare* na criação de tambaquis. Em adição, vislumbra-se como perspectiva para continuidade deste estudo a avaliação da atividade antiparasitária dos compostos isolados destes óleos essenciais, das nanoformulações, bem como das interações sinérgicas entre óleos essenciais para aumentar a eficácia dos tratamentos aplicados para o controle de *P. pillulare* na criação de tambaquis, buscando contribuir com tratamentos alternativos naturais para promoção da aquicultura sustentável.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOULDING, M. **Fruitful a fish**. Columbia University Press. New York, 191p, 1998.
- AZAMBUJA, C. R. et al. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, v. 319, p. 156–161, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.002>.
- AMORIM-NETO, B. J. C. Ocorrência do *Piscinoodinium pillulare* (Dinoflagellida) em tambaqui *Colossoma macropomum*, cultivado em pisciculturas comerciais. **Dissertação** (Mestrado em Aquicultura) Universidade Nilton Lins, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 38p. 2015.
- ANDRADE-PORTO, S. M. et al. Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas*. **Aquaculture**, v. 479, p. 38-44, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.009>.
- ARBILDO-ORTIZ, H. et al. Primer registro de infestación de *Piscinoodinium pillulare* (Dinoflagellida) en juveniles de *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) en cultivo semi-intensivo en Loreto, Perú. **Revista Investigaciones Veterinarias del Perú**. v. 31, n. 3: p. 1–7, 2020. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.16662>.
- AYDIN, B.; BARBAS, L. A. L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review, **Aquaculture**, v. 520, 734999, 2020.
- BRANT, R. S. et al. Teor do óleo essencial de cidrão [*Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton] em função da variação sazonal. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 10, n. 2, p. 83-88, 2008.
- BRABO, M. F. et al. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 50-58, 2016. [10.2312/ActaFish.2016.4.2.50-58](https://doi.org/10.2312/ActaFish.2016.4.2.50-58).
- BRUM, A. et al. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 468, p. 235–243, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.020>.
- BANDEIRA-JUNIOR, G. B. et al. *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* essential oils are anxiolytic without inducing aversiveness in fish. **Aquaculture**, v. 482, p. 49–56, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.023>.
- BARRIGA, I. B. et al. Essential oil of *Lippia grata* (Verbenaceae) is effective in the control of monogenean infections in *Colossoma macropomum* gills, a large Serrasalminidae fish from Amazon. **Aquaculture Research**, v. 51, p. 3804-3812, 2020.

- BRANDÃO, F. R. et al. Anesthetic potential of the essential oils of *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* for *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 534, p. 736-275, 2021. 10.1016/j.aquaculture.2020.736275.
- CARNEIRO, P. C. F; SCHORER, M.; MIKOS, J. D. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Randia quelen*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 99-102, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000100015>.
- CHIARA-BULFON, D. V.; GALEOTTI, M. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. **Aquaculture Research**, v. 46, p. 513–551, 2015. <https://doi.org/10.1111/are.12238>.
- 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>.
- 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. 10.20950/1678-2305.2019.45.2.499.
- CYRINO, J. E. P. et al. Mitos e insinuações na Aquicultura: sim, estamos seguros. **Revista E&C.**, v. 1, e20200003, 2020. 10.22167/2675-6528-20200003.
- DEZON DE FOGEL, D. E. et al. Parasitosis en *Colossoma macropomum* (Pisces: Characidae) cultivado, ocasionada por los protozoos *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) y *Piscinoodinium pillulare* (Schäperclaus). **Saber**, v. 16, n. 1, p. 3-8, 2004.
- DAWOOD, M. A. O. et al. Antiparasitic and Antibacterial Functionality of Essential Oils: An Alternative Approach for Sustainable Aquaculture. **Pathogens**, v. 10, p. 1-38, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020185>.
- FERREIRA-JUNIOR, J. A. et al. Surto de infecção por *Piscinoodinium pillulare* e *Trichodina* spp. em tambaquis (*Colossoma macropomu*), pirapitingas (*Piaractus brachypomus*) e tilápias (*Oreochromis niloticus*) no Distrito Federal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n.1, p.1-5, 2018. 10.22456/1679-9216.86827.
- FERREIRA, L. C. et al. Antiparasitic activity of *Mentha piperita* (Lamiaceae) essential oil against *Piscinoodinium pillulare* and its physiological effects on *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Aquaculture**, v. 512, p. 734-343, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734343>.

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. 10.1590/1678-4162-10306.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The state of World Fisheries and Aquaculture). 28p. 2020. Acessado em 03 de setembro de 2021.

GODOI, M. M. I. M. et al. Parasite-host relationship between the tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier 1818) and ectoparasites, collected from fish farms in the city of Rolim de Moura, State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 515-524, 2012.

GOMES, A. L. S. et al. A fast and practical method for initial diagnosis of *Piscinoodinium pillulare*. **Ciencia Rural**, v. 48, n. 7, p. 1-3, 2018. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170680>.

IZEL, A. C. U. et al. Produção intensiva de tambaqui em tanques escavados com aeração. Embrapa Amazônia Ocidental (Circular técnica 39); Manaus, AM, 4p, 2013. Disponível em: <https://www.aquamat.com.br/wp>. Acesso em 09 de setembro de 2021.

JERÔNIMO, G. T. et al. Parasitos de peixes Characiformes e seus híbridos cultivados no Brasil. In: Tavares-Dias, M.; Mariano, W. S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. São Carlos: PEDRO & JOÃO, v. 1, p. 283-304, 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, 544 p. 2008.

MARTINS, M. L. et al. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes. A survey of diagnosticated cases from 1993 to 1998. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 23-28, 2000.

MARTINS, M. L. et al. *Piscinoodinium pillulare* (Schäperclaus, 1954) Lom, 1981 (Dinoflagellida) Infection in cultivated freshwater fish from the Northeast Region of São Paulo State, Brazil. Parasitological and pathological aspects. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 4, p. 639–644, 2001. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842001000400013>.

MACIEL, P. O. et al. *Myxobolus* sp. (Myxozoa) in the circulating blood of *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Characidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 80-84, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000100018>

MARCHIORI, N. C.; MARTINS, M. L. Flagellata. In: PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. (Org.). Parasitologia de peixes de água doce do Brasil. Maringá: EDUEM, v. 31, n. 1: p. 133-143, 2013.

- MARTINS, M. L. et al. Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 1–20, 2015. 10.1590/S1984-29612015013.
- MACIEL, P. O. et al. Trichodinidae in commercial fish in South America. **Reviews in fish Biology and Fisheries**, v. 28, p. 33-56, 2018. <https://doi.org/10.1007/s1160-017-9490-1>.
- MONTEIRO, P. C. et al. Short-term baths with essential oils of *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* influence the health of *Colossoma macropomum* after infection with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, 2021.
- NEBBIA, C. et al. *In vitro* interactions of malachite green and leucomalachite green with hepatic drug-metabolizing enzyme systems in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Toxicology Letters**, v. 280, p. 41-47, 2017. 10.1016/j.toxlet.2017.07.900.
- NIZIO D. A. C et al. Essential oils of *Varronia curassavica* accessions have different activity against white spot disease in freshwater fish. *Parasitol Res* 117: 97–105. 2017.
- OLIVEIRA, M. I. B. et al. In vitro anthelmintic efficacy of essential oils in the control of *Neoechinorhynchus buttnerae*, an endoparasite of *Colossoma macropomum*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, p. 1-14, 2021. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1921065>.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: Eduem, 3ª ed. 311p. 2008.
- PEREIRA, J. N.; MOREY, G. A. M. First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacantocephala, Neochinorhynchidae) on *Colossoma macropomum* (Characidae) in a fish farm in Roraima, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p.42-45, 2018. 10.1590/1809-4392201702411.
- PETERFALVI, A. et al. Much More Than a Pleasant Scent: A Review on Essential Oils Supporting the Immune System. **Molecules**, v. 24, 4530, p. 1-16, 2019. 10.3390/molecules24244530.
- PEIXEBR. **Anuário brasileiro de piscicultura**. 2021. 71p. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuariopeixe-br-da-piscicultura-2021/>>. Acessado em 09 de Setembro de 2021.
- REVERTER, M. et al. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. **Aquaculture**, v. 433, p. 50–61, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>.
- RODRIGUES, R. N. et al. First record of infection by *Trypanosoma* sp. of *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae), a neotropical fish cultivated in the Brazilian Amazon. **Journal**

- of **Applied Aquaculture**, v. 30, n. 1, p. 29–38, 2018. <https://doi.org/10.1080/10454438.2017.140642>.
- SHAHAROM-HARRISON, F. M. et al. Epizootics of Malaysian cultured fresh water pond fishes by *Piscinoodinium pillulare* (Schaperclaus 1954) Lom 1981. **Aquaculture**, v. 86, n. 2–3, p. 127–138, 1990. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90107-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90107-X).
- SALIMENA, F. R. G. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* sect. *Rhodo lippia* (verbenaceae). *Darwiniana*, v.40, p.1-4, 2002.
- SANT'ANA, et al. Surtos de infecção por *Piscinoodinium pillulare* e *Henneguya* spp. em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) criados intensivamente no Sudoeste de Goiás. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 121-125. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000200005>.
- SANTOS, E. F. et al. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. **Acta amazônica**, v. 43, n. 1, p. 105–112, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672013000100013>.
- SHINN, A. J. et al. Economic impacts of aquatic parasites on global fin fish production. **Global Aquaculture Advocate**, p. 58–61. 2015.
- SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2017. [10.2312/ActaFish.2017.5.1.1-9](https://doi.org/10.2312/ActaFish.2017.5.1.1-9).
- SOARES, B. V. et al. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **Veterinary Parasitology**, v. 234, p. 49–56, 2017a. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.012>.
- SOARES, B. V. et al. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia organoides* (Verbenaceae) in native fresh water fish *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 469, p. 72–78, 2017b. [10.1016/j.aquaculture.2016.12.001](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001).
- SOUSA, R. L. et al. Infectious agents and parasites that affect tambaqui (*Colossoma macropomum*) and treatments used to control these pathogens: a systematic review. **Scientia Amazonia**, v. 9, n. 3, 2020.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Ocorrência de ectoparasitos em *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characidae) cultivados em estação de piscicultura na Amazônia central. In: Congresso Iberoamericano Virtual De Acuicultura, 4., 2006, Madri. [Anais...]. Madri: Observatorio Español de Acuicultura; Sociedade Española de Acuicultura, 2006. p. 726-731. CIVA 2006.

- TAVARES-DIAS, M. et al. New hosts and distribution records of *Braga patagonica*, a parasite cymothoidae of fishes from the Amazon. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 91-97, 2014. 10.14210/bjast.v18n1.p91-97.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Distribution pattern of crustacean ectoparasites of freshwater fish from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 136-147, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015036>.
- 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. 10.1007/s12639-017-0938-y.
- TAVARES-DIAS, M. Living Resources Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites: Review. **Aquatic Living Resources**, v. 31, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1051/alr/2018001>.
- TAVARES-DIAS, M. Toxicity, physiological, histopathological and antiparasitic effects of the formalin, a chemotherapeutic of fish aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 52, p. 1803-1823, 2021a. <https://doi.org/10.1111/are.15069>.
- 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. 10.1007/s12639-017-0938-y.
- VALENTI, W. C. et al. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, 100611, p. 1-18, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>.
- ZEPPENFELD, C. C. et al. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture**, v. 418–419, p. 101–107, 2014. 10.1016/j.aquaculture.2013.10.013
- ZEPPENFELD, C. C. et al. *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen*: Stress and antioxidante parameters. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6: p. 1362–1367, 2017. <https://doi.org/10.1111/anu.12511>.
- ZHU, F. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. **Aquaculture**, v. 526, p. 735422, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735422>.