



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**



**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS PARA O  
TRATAMENTO DE ENFERMIDADE EM PEIXES**

**GUSTAVO MORAES RAMOS VALLADÃO**

Médico veterinário

**JABOTICABAL – SÃO PAULO**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS PARA O  
TRATAMENTO DE ENFERMIDADE EM PEIXES**

**GUSTAVO MORAES RAMOS VALLADÃO**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Fabiana Pilarski**

Dissertação apresentada  
ao programa de pós-  
graduação em aquicultura  
como parte das exigências  
para a obtenção do título  
de Mestre em Aquicultura

**JABOTICABAL – SÃO PAULO**

**2014**

V176p Valladão, Gustavo Moraes Ramos  
Potencial de óleos essenciais de plantas para o tratamento de  
enfermidade em peixes / Gustavo Moraes Ramos Valladão. --  
Jaboticabal, 2014  
vi, 78 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Centro  
de Aquicultura, 2014

Orientadora: Fabiana Pilarski

Banca examinadora: Reinaldo José da Silva, Eduardo Makoto

Onaka

Bibliografia

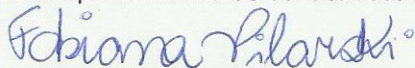
1. Planta medicinal. 2. Aquicultura. 3. *Ichthyophthirius multifiliis*. 4.  
*in vitro*. 5. Eficácia. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura da  
Unesp.

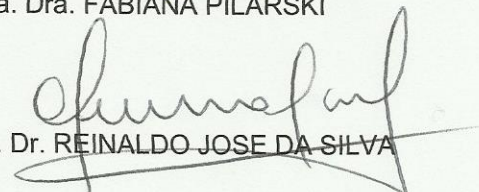
CDU 639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.  
email: gustavovalladao@fmva.unesp.br

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GUSTAVO MORAES RAMOS VALLADÃO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA, DO(A) CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP.**

Aos 19 dias do mês de fevereiro do ano de 2014, às 09:00 horas, no(a) Sala de Aulas da Pós-Graduação - CAUNESP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. FABIANA PILARSKI do(a) Laboratório de Patologia de Peixes, CAUNESP, Jaboticabal-SP, Prof. Dr. REINALDO JOSE DA SILVA do(a) Departamento de Parasitologia / Instituto de Bociências de Botucatu, Prof. Dr. EDUARDO MAKOTO ONAKA do(a) Departamento de Descentralização do Desenvolvimento / Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegocios, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GUSTAVO MORAES RAMOS VALLADÃO, intitulado "Potencial de óleos essenciais de plantas para o tratamento de enfermidade em peixes". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

  
Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

  
Prof. Dr. REINALDO JOSE DA SILVA

  
Prof. Dr. EDUARDO MAKOTO ONAKA

## **AGRADECIMENTOS**

AGRADEÇO À MINHA FAMÍLIA, QUE MESMO NA DISTÂNCIA ME APOIA EM MINHAS DECISÕES, ALÉM DE TER DADO TODO O NECESSÁRIO PARA QUE EU PUDESSE CONQUISTAR MEUS SONHOS.

SOU GRATO...

À MINHA ORIENTADORA FABIANA PILARSKI POR TER DADO A OPORTUNIDADE DE TRABALHAR EM SEU LABORATÓRIO DESDE O ESTÁGIO SUPERVISIONADO, PELOS ENSINAMENTOS, AMIZADE E CONFIANÇA DURANTE TODO ESTE PERÍODO, E À PROF<sup>a</sup> MARILI V. N. RODRIGUES POR FAZER PARTE DA CRIAÇÃO DESTE PROJETO, ALÉM DE ENSINAMENTOS E ANÁLISES DOS FITOTERÁPICOS.

À MINHA NAMORADA SÍLVIA U. GALLANI E SUA FAMÍLIA PELO CARINHO E RESPEITO E À MINHA COLEGA DE TRABALHO SÍLVIA U. GALLANI PELO PLANEJAMENTO, CRÍTICA, AJUDA E REVISÃO DE TODO ESTE PROJETO.

AOS COLEGAS DO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, QUE FIZERAM E FAZEM PARTE DA MINHA TRAJETÓRIA NA PÓS-GRADUAÇÃO E À EQUIPE DO NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS AMBIENTAIS EM MATOLOGIA QUE SEMPRE FORAM ATENCIOSOS E DISPOSTOS EM AJUDAR NESTE PROJETO, COM AGRADECIMENTO ESPECIAL À CYNTHIA V. IKEFUTI E AO PROF. CLAUDINEI DA CRUZ.

AOS COLEGAS DISCENTES, FUNCIONÁRIOS E PROFESSORES DO CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP (CAUNESP).

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) POR TER CONCEDIDO BOLSA E AUXÍLIO DE ESTUDO (PROCESSO: 2012/19414-7).

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1 – USO DE FITOTERÁPICOS PARA O TRATAMENTO DE ENFERMIDADES DE PEIXES.....</b>	<b>6</b>
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Doenças em aquicultura.....	12
2.1.1. Intensificação da atividade e patógenos.....	12
2.1.2. Ictiofitiríase.....	13
2.2. Tratamento em aquicultura.....	16
2.2.1. Tratamentos convencionais para doenças de peixes.....	16
2.2.2. Fitoterápicos: tratamento alternativo.....	19
2.2.3. Óleos essenciais de <i>Melaleuca alternifolia</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> e <i>Mentha piperita</i> .....	31
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
<b>CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONTRA <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> E CONTROLE DA ICTIOFITIRÍASE COM ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i>.....</b>	<b>54</b>
RESUMO.....	55
ABSTRACT.....	56

1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
2.1. Óleos essenciais de plantas (OEP).....	58
2.2. Hospedeiro e parasitos.....	59
2.3. Estudo in vitro.....	60
2.4. Estudo in vivo.....	62
2.5. Diagnóstico de infecção bacteriana secundária.....	63
2.6. Análise estatística.....	64
3. RESULTADOS.....	64
3.1. Análise dos óleos essenciais.....	64
3.2. Estudo in vitro.....	65
3.3. Efeito in vivo do OE de <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	67
3.4. Diagnóstico de infecção bacteriana secundária.....	69
4. DISCUSSÃO.....	69
5. CONCLUSÃO.....	73
6. AGRADECIMENTOS.....	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
<b>CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>81</b>
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 1 – USO DE FITOTERÁPICOS PARA O TRATAMENTO DE ENFERMIDADES DE PEIXES**

Figura 1. O ciclo de vida de *Ichthyophthirius multifiliis*. Trofante (a); tomonte (b); tomonte encistado (c); tomitos em desenvolvimento no cisto (d); ruptura do cisto com liberação de tomitos (e); cada tomito se diferencia em um teronte (f); terontes invadem o epitélio do seu hospedeiro, no qual se desenvolverá e continuará o ciclo (g). Adaptado de Wei et al. (2013).....14

### **CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONTRA O *Ichthyophthirius multifiliis* E CONTROLE DA ICTIOFITIRÍASE COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia***

Figura 1. Sobrevivência (%) de peixes, durante teste *in vivo*, no tratamento da ictiofitiríase. Grupo 1 (peixes parasitados tratados com 50 µ/L *Melaleuca alternifolia*), grupo 2 (peixes parasitados expostos a 100 µ/L DMSO), grupo 3 (peixes parasitados) e grupo 4 (peixes sadios).....67



## ÍNDICE DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 – USO DE FITOTERÁPICOS PARA O TRATAMENTO DE ENFERMIDADES DE PEIXES**

Tabela 1. Fitoterápicos com maiores potenciais para uso em aquicultura no tratamento de enfermidades parasitárias.....21

Tabela 2. Fitoterápicos estudados em aquicultura no tratamento de enfermidades bacterianas.....27

Tabela 3. Fitoterápicos estudados em aquicultura no tratamento de enfermidades fúngicas...30

### **CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONTRA O *Ichthyophthirius multifiliis* E CONTROLE DA ICTIOFITIRÍASE COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia***

Tabela 1. Identificação dos componentes químicos dos óleos essenciais (OE) de *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* e *Mentha piperita*.....59

Tabela 2. Média dos parâmetros de água mensurados durante o teste *in vivo*.....63

Tabela 3. Mortalidade média (%) das quatro horas de contagem, de trofontes de *Ichthyophthirius multifiliis* expostos aos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* e *Mentha piperita* em quatro concentrações.....65

Tabela 4. Mortalidade (%) *in vitro* de trofontes de *Ichthyophthirius multifiliis* expostos aos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* e *Mentha piperita* em quatro concentrações durante quatro horas.....66

Tabela 5. Número de trofontes de *Ichthyophthirius multifiliis* encontrados em brânquia e tegumento de peixes infestados experimentalmente, antes e após tratamento com o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.....68

## **CAPÍTULO 1**

### **USO DE FITOTERÁPICOS NO TRATAMENTO DE ENFERMIDADES DE PEIXES**

## RESUMO

Esta revisão esclarece as perspectivas em relação aos tratamentos atuais e futuros de enfermidades de peixes. Atualmente, surto de doenças parasitárias e bacterianas tem atuado como importante fator limitante para a piscicultura. Com isso os produtores tem lançado mão de massivas quantidades de antimicrobianos e desinfetantes para controlar mortalidades e evitar grandes perdas econômicas. A terapêutica em doenças em peixes é vista com criticismo devido aos efeitos colaterais dos produtos disponíveis para uso nos dias de hoje, sendo necessários estudos de tratamentos alternativos eficazes e mais seguros. O uso de fitoterápicos na produção animal tem se mostrado promissor por serem produtos naturais, biodegradáveis e com atividade antimicrobiana contra diversos patógenos, inclusive de peixes. Em experimentos *in vitro* e *in vivo*, foi avaliado o potencial de três fitoterápicos contra um importante patógeno de peixe, *Ichthyophthirius multifiliis*. Foram utilizados os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* e *Mentha piperita*, os quais mostraram atividade *in vitro* contra *I. multifiliis* e o tratamento com o óleo essencial de *M. alternifolia* na água foi eficaz contra a doença causada por este parasito. Os três fitoterápicos apresentaram potencial como substitutos aos atuais tratamentos utilizados para controlar esta importante parasitose em peixe.

**Palavras-chave:** planta medicinal, aquicultura, *Ichthyophthirius multifiliis*, *in vitro*, eficácia.

## **ABSTRACT**

This study explains about prospects in relation to current and future treatments for fish diseases. Currently, outbreaks of parasite and bacterial diseases have acted as an important limiting factor for fish farming. So producers have made use of massive amounts of chemicals and antibiotics to control mortalities and avoid economic losses. The therapy of fish diseases is not well regarded due to the side effects of the products available for use today, thus, studies of safer and more effective alternative treatments are needed. The use of herbal medicines in animals has shown promising to be a natural, biodegradable and have antimicrobial activity against many pathogens, including fish. In *in vitro* and *in vivo* experiments, we evaluated the potential of three herbal medicines against an important pathogen of fish, *Ichthyophthirius multifiliis*. Essential oils of *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* and *Mentha piperita*, showed *in vitro* activity against *I. multifiliis*. Treatment with the essential oil of *M. alternifolia* in water was effective against the disease caused by this parasite. These three herbal oils showed potential as replacements to current treatments used to control of this important parasitic disease in fish.

**Key-words:** medicinal plant, aquaculture, *Ichthyophthirius multifiliis*, *in vitro*, efficacy.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento da atividade aquícola promove o aumento de práticas inadequadas que desconsideram os cuidados com o meio ambiente e a saúde dos animais. Os sistemas intensivos estão frequentemente associados com aumento de densidade e volume de estoque e o uso massivo de ração artificial, muitas vezes de má qualidade. Todas estas características, em conjunto, atuam diretamente sobre a relação patógeno/ambiente/hospedeiro. Esta relação ocorre de forma equilibrada no ambiente natural, ao contrário dos sistemas intensivos que invariavelmente atuam favorecendo o desenvolvimento de patógenos, enquanto afetam negativamente as características ambientais e os mecanismos de defesa do hospedeiro.

Diversos pesquisadores têm sido estimulados a encontrar soluções para os problemas sanitários atuais da aquicultura. Algumas das soluções para o controle e prevenção de doenças em peixes é o desenvolvimento de produtos profiláticos como vacinas (Pridgeon e Klesius, 2013) e dietas imunoestimulantes (Skalli et al., 2013), sendo que dentro destas, vários fitoterápicos têm mostrado resultados promissores na profilaxia de doenças e melhora de resposta imunológica (Samad et al., 2013; Vaseeharan e Thaya, 2013). Ainda assim, para o controle dos surtos de mortalidade causados pelos diferentes patógenos, visando ao menos diminuir a pressão destes sobre o hospedeiro, torna-se imprescindível a utilização de algum produto terapêutico em alguma fase da produção.

Existe uma grande lacuna quando discorremos sobre os tratamentos utilizados para o controle de doenças em peixes no mundo. A falta de produtos veterinários registrados para uso na aquicultura é um problema atual e mundial, e assim como em outros países, no Brasil, muitas das informações sobre tratamentos são extrapoladas de peixes de água fria como salmonídeos (Athanassopoulou et al., 2004) para peixes tropicais. As drogas utilizadas na aquicultura são antimicrobianos, desinfetantes e produtos químicos, as quais tem um futuro

incerto devido aos vários efeitos negativos que provocam no ambiente aquático, organismos não-alvos, peixes e nos humanos.

As principais críticas em torno dos produtos terapêuticos são a presença de resíduos na água, sedimento e pescado, toxicidade em organismos não alvos como plantas, crustáceos e até peixes selvagens, potencial carcinogênico para manipuladores e consumidores, e resistência bacteriana (Sapkota et al., 2008; Burridge et al., 2010; Rico et al., 2013; Rico & Brink, 2014). Ainda assim, produtores tem lançado mão de produtos altamente tóxicos e não registrados para uso contra parasitoses de peixes.

A utilização indiscriminada de substâncias sem registro e com grande potencial tóxico é preocupante. Em revisão sobre o uso de quimioterápicos na salmicultura, Burridge et al. (2010) descreveram a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de intervenções adequadas e com menores riscos.

Com relação ao descrito anteriormente, pesquisas sobre o potencial de fitoterápicos no tratamento de doenças de peixes estão sendo frequentemente encorajadas. Estas substâncias tem sua atividade descrita há séculos no tratamento de infecções bacterianas e infestações parasitárias de humanos e animais (Silva e Fernandes-Junior, 2010), sendo potenciais terapêuticos no controle dos patógenos de peixes.

Diversos pesquisadores tem testado grande variedade de fitoterápicos *in vitro*, a fim de obter as melhores substâncias para estudos *in vivo*. Atualmente os testes *in vitro* são executados em busca de efeito parasiticida (Ji et al., 2012; Yi et al., 2012), bactericida (Ostrand et al., 2012; Albert e Ransangan, 2013) e fungicida (Xue-Gang et al., 2013) das plantas medicinais contra os principais patógenos na aquicultura, enquanto os testes *in vivo* têm mostrado efeitos positivos no tratamento e recuperação de doenças em peixes (Muniruzzaman e Chowdhury, 2008; Harikrishnan et al., 2010a,c; Abd El-Galil e Aboelhadid,

2012; Schelke et al., 2013). O uso dos fitoterápicos na aquicultura é de fato promissor, sendo considerado um possível substituto aos tratamentos convencionais, altamente tóxicos.



## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Doenças em peixes**

#### **2.1.1. Intensificação da atividade e patógenos**

Nos últimos anos, a criação de peixes vem sendo estimulada em todo o mundo, recebendo especial destaque em 2012, ao ultrapassar a produção de carne bovina (Earth Policy Institute, 2013). Na cadeia produtiva, a busca pelo máximo de produtividade em um curto período de tempo e com menor custo, acarreta em alguns entraves que direta ou indiretamente afetam o status sanitário da produção. Densidades elevadas de estocagem (Garcia et al., 2013), má qualidade nutricional, má qualidade do ambiente aquático (Longo et al., 2013) e ausência de medidas de biossegurança estão entre os principais problemas da aquicultura, principalmente na criação de peixes.

Há décadas, um dos principais entraves sanitários ocasionados pela intensificação na criação de peixes é a ocorrência de infestações parasitárias (Kugel et al., 1990), seguida ou não pela presença de patógenos oportunistas. Diversos agentes parasitários afetam a produção de peixes, causando queda de produtividade (Evans et al., 2007) até surtos de mortalidades (Khan, 2009), que conseqüentemente, geram perdas econômicas significativas. Entre as principais parasitoses em aquicultura, são destacados, os parasitos visíveis a olho nu, como lerneídeos (Raissy et al., 2013) e braquiúros (Pekmezci et al., 2011), além dos parasitos microscópicos mixosporídios (Müller et al., 2013), tricodinídeos (Valladão et al., 2013), monogenéticos (Akooll et al., 2012) e *Ichthyophthirius multifiliis* (Wei et al., 2013), todos responsáveis por causar perdas em peixes de produção.

Infecções secundárias por agentes bacterianos oportunistas são comuns em aquicultura. Isso geralmente ocorre quando o hospedeiro está exposto a más condições de criação ou ambientais, que ocasiona queda do sistema imunológico, seja por má nutrição, estresse e desafios recorrentes. Além disso, é comum a ocorrência dos patógenos primários

(geralmente parasitos) aumentando a susceptibilidade do hospedeiro às doenças bacterianas (Xu et al., 2012a,c). Entre as principais bacterioses em peixes de água continental estão as causadas por bactérias dos gêneros *Streptococcus* (Zhang et al., 2013), *Aeromonas* (Griffin et al., 2013), *Flavobacterium* (Sebastião et al., 2013; Evenhuis et al., 2014), *Edwardsiella* (Park et al., 2012; Hawke et al., 2013) e *Francisella* (Soto et al., 2013).

### **2.1.2. Ictiofitiríase**

*Ichthyophthirius multifiliis* é um protozoário ciliado cosmopolita, causador da parasitose chamada ictiofitiríase, ou popularmente conhecida como “doença dos pontos brancos”. A ictiofitiríase constitui um grave problema para aquicultura mundial (Bisharyan et al., 2003) e é considerada uma das parasitoses mais patogênicas para peixes (Yao et al., 2011a), afetando diversas espécies, sem exibir especificidade de hospedeiro.

Peixes de importância para a aquicultura mundial são acometidos por esta parasitose todos os anos, desde carpa *Cyprinus carpio* (Witeska et al., 2010), truta *Oncorhynchus mykiss* (Picón-Camacho et al., 2012b), bagre do canal *Ictalurus punctatus* (Xu et al., 2012d) e, no Brasil, acomete a produção de tilápia *Oreochromis niloticus* (Pantoja et al., 2012) e de peixes nativos como surubim *Pseudoplatystoma reticulatum* (Jeronimo et al., 2013), jundiá *Rhamdia quelen* (Garcia et al., 2011) e pacu *Piaractus mesopotamicus* (Franceschini et al., 2013), diminuindo as chances de sucesso da produção destes peixes.

O ciclo de vida de *I. multifiliis* é composto por diferentes fases de vida livre e uma fase parasitária (Matthews, 2005). A infestação se inicia com a penetração dos terontes (fase de vida livre nadante no ciclo do parasito) no tecido epitelial do tegumento e brânquia de peixes, locais nos quais o parasito passa a se alimentar e desenvolver, caracterizando a fase parasitária chamada de trofonte (Ling et al., 2010). Trofontes maduros saem do hospedeiro se diferenciando em tomontes, para que o ciclo continue na água. Nesta etapa, ocorre o

encistamento do parasito. Os tomontes encistados se mantêm na água, e quando as condições ambientais são favoráveis, inúmeros tomítos se desenvolvem em seu interior e são liberados, se diferenciando na forma infectante teronte, que posteriormente, nadará até encontrar um hospedeiro susceptível (Matthews, 2005). O ciclo de *I. multifiliis* é direto ou monoxênico, ou seja, não depende da presença de hospedeiro intermediário para seu desenvolvimento (Figura 1.)

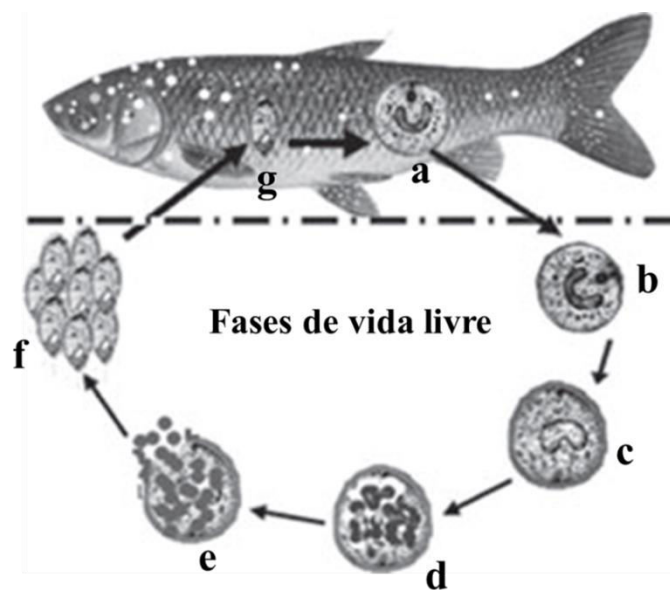


Figura 1. O ciclo de vida de *Ichthyophthirius multifiliis*. Trofante (a); tomonte (b); tomonte encistado (c); tomítos em desenvolvimento no cisto (d); ruptura do cisto com liberação de tomítos (e); cada tomito se diferencia em um teronte (f); terontes invadem o epitélio do seu hospedeiro, no qual se desenvolverá e continuará o ciclo (g). Adaptado de Wei et al. (2013).

A taxa de morbidade da ictiofitiríase pode atingir até 100%, causando grandes perdas econômicas (Hanson et al., 2008; Osman et al., 2009). Em casos graves de infestação, as mortes ocorrem principalmente por comprometimento respiratório (Wei et al., 2013). Lesões

microscópicas como úlceras e necrose de tegumento e brânquia, associadas à severa resposta inflamatória são comumente descritas nesta enfermidade (Matthews, 2005; Elsayed et al., 2006; Wei et al., 2013). Altas taxas de mortalidade estão associadas com a falta de tratamentos adequados para peixes de produção, pois ao contrário dos terapêuticos para mamíferos, as drogas antiparasitárias são limitadas em peixes (Athanassopoulou et al., 2004).

Além disso, *I. multifiliis* pode ser responsável pelo aparecimento de doenças oportunistas, como infecções bacterianas causadas pela *Aeromonas hydrophila* (Xu et al., 2012a) e *Edwardsiella ictaluri* (Xu et al., 2012c). Xu et al. (2012b) sugeriram, inclusive, que *I. multifiliis* pode atuar como um vetor de *E. ictaluri*, uma bactéria patogênica causadora da edwardsiellose.

Para controlar os efeitos devastadores deste protozoário, diversos produtos químicos têm sido empregados. Picón-Camanho et al. (2012a) revisaram 116 compostos aplicados para controle de *I. multifiliis* desde 1980, sendo a grande maioria químicos artificiais, altamente indesejáveis para uso em cursos de água, o que pode justificar a escassez de produtos comerciais, apesar dos inúmeros estudos já publicados. Um dos principais quimioterápicos utilizados por décadas no tratamento da ictiofitiríase é o verde malaquita, que é altamente eficiente, tem um baixo custo, porém é banido em diversos países da Europa e em outros continentes por seu impacto sobre a saúde dos humanos (Yi et al., 2012) e danos ao meio ambiente (Henderson et al., 1997). Não menos empregados no combate da ictiofitiríase, a formalina, o sulfato de cobre (Farmer et al., 2013) e o permanganato de potássio (Rintamäki-Kinnunen et al., 2005) apresentam efeitos deletérios sobre o meio ambiente, organismos não alvos e manipuladores.

Em vista do exposto, pesquisas avaliando o potencial de fitoterápicos contra *I. multifiliis* são estimuladas. O extrato de alho foi eficaz contra tomites nas concentrações de 117 mg/L e 570 mg/L após 24 horas de teste *in vitro* (Buchmann et al., 2003), e os extratos de

*Mucuna pruriens* (150 mg/L) e *Carica papaya* (200 mg/L) mostraram 100% de eficácia contra a fase parasitária trofante após 6 horas de teste *in vitro* e redução de 92% do parasito na pele, redução de 91% do parasito nas brânquias após tratamento com *M. pruriens* (200 mg/L), além de ser observada 20% de mortalidade nos peixes do grupo tratado e 65% de mortalidade no grupo controle (Ekanem et al., 2004).

Nos últimos anos, devido à crescente preocupação com o meio ambiente e saúde pública, pesquisas sobre utilização dessas substâncias, “ambientalmente amigáveis”, para o controle de *I. multifiliis* tem sido amplamente divulgadas, devido aos efeitos sobre as diversas fases do ciclo do parasito. Após estudo com 30 plantas medicinais, Yi et al. (2012) concluíram que os extratos metanólicos de *Magnolia officinalis* e *Sophora alopecuroides* apresentam alta atividade antiprotozoária contra terontes, com concentração letal (CL50-4h) estimada em 2,45 e 3,43 mg/L, respectivamente. Ainda, 20 mg/L do extrato de *M. officinalis* resultou em 100% de mortalidade de tomontes após 20 horas de exposição, a mesma taxa de mortalidade foi observada para 320 mg/L de *S. alopecuroides*. Zhang et al. (2013) observaram sobrevivências de 53,3% e 93,3% em bagre do canal infectado por *I. multifiliis* e tratado com 10 mg/L e 20 mg/L de pentagalloylglucose (composto ativo da *Galla chinensis*), respectivamente, em banhos diários por 10 dias.

*Ichthyophthirius multifiliis* foi escolhido para este estudo baseado em sua importância e pela necessidade de tratamentos alternativos contra este protozoário que causa perdas significativas todos os anos na piscicultura mundial e, principalmente na brasileira.

## **2.2. Tratamento em aquicultura**

### **2.2.1. Tratamentos convencionais para doenças de peixes**

O tratamento de doenças em animais de produção se faz necessário independentemente da espécie ou tipo de criação. A pressão dos patógenos sobre o hospedeiro

é grande em sistemas intensivos de cultivo e, por vezes, o uso de drogas terapêuticas é essencial, não sendo diferente em aquicultura. As substâncias mais utilizadas em aquicultura são desinfetantes parasiticidas e antibióticos.

Na aquicultura, os desinfetantes são caracterizados por reduzir a carga de organismos patogênicos sobre a superfície biológica dos organismos aquáticos, e o uso destes em peixes está associado a seu amplo espectro, rápida ação e baixo preço (Burka et al., 1997). As substâncias mais conhecidas são o peróxido de hidrogênio, a amônia quaternária, a formalina e o verde malaquita. Esses compostos são utilizados principalmente no tratamento de doenças parasitárias (Picón-Camacho et al., 2012a) e fúngicas (Sudova et al., 2007) em peixes.

Entre os desinfetantes, a formalina é um dos produtos mais empregados no tratamento de doenças causadas por *Saprolegnia parasitica* (Giesecker et al., 2006), monogenéticos (Pahor-Filho et al., 2012), tricodinídeos (Noga, 2010) e *I. multifiliis* (Heinecke e Buchmann, 2009), no entanto, peixes sobreviventes ao tratamento podem ter sua saúde comprometida (Tieman e Goodwin, 2001). Apesar do baixo potencial de se bioacumular no meio ambiente e organismos aquáticos, seus efeitos deletérios sobre o peixe e o contato direto de trabalhadores com este produto representa riscos, tornando incerto seu futuro uso na aquicultura (Picón-Camacho et al., 2012a).

O verde malaquita foi amplamente usado no controle de diferentes parasitos de peixes, principalmente no combate ao *I. multifiliis* por ser eficaz contra este importante patógeno de peixe (Srivastava et al., 2004). No entanto, este produto é banido em diversos países devido seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos (Picón-Camacho et al., 2012a), além de ser altamente persistente no meio ambiente, bioacumulando no ecossistema e no tecido dos peixes (Henderson et al., 1997).

Outros produtos largamente utilizados em importantes doenças de peixes são os antibióticos. O florfenicol e oxitetraciclina são as moléculas mais conhecidas no Brasil e têm

seu uso aprovado em aquicultura no controle de doenças bacterianas em várias espécies de peixes (U.S. Food and Drug Administration, 2012). No entanto, diversos outros antimicrobianos têm sido utilizados na aquicultura, mesmo sem registro e aprovação (Rico et al., 2013).

A utilização dos quimioterápicos na aquicultura pode representar riscos à segurança alimentar dos consumidores de peixes (Heuer et al., 2009; Love et al., 2011), bem como proporcionar lesões tóxicas aos peixes e efeitos deletérios sobre o ecossistema aquático (Tavechio et al., 2009). A maior parte dos desinfetantes e parasiticidas utilizados atualmente na aquicultura são altamente tóxicos, sendo capazes de afetar microorganismos não alvos, o que contribuí para a degradação ambiental (Rico et al., 2012).

Os parasiticidas mostram risco ambiental maior do que os antibióticos (Rico e Brink, 2014), além de afetar a saúde humana por conter efeitos tóxicos e mutagênicos, enquanto o uso indiscriminado de antibióticos no tratamento e profilaxia de bacterioses de peixes está associado à seleção de bactérias resistentes. A resistência não é exclusiva de bactérias de peixes, mas sim de todas as bactérias presentes no ambiente, seja de outros animais e até mesmo humanos, se caracterizando em um grave problema de saúde pública (Sapkota et al., 2008; Burridge et al., 2010).

Burka et al. (1997) descreveram há mais de 15 anos o uso dessas drogas no tratamento “off-label” de doenças na aquicultura, que é uma prática utilizada largamente até os dias atuais, e caracterizada pelo uso de drogas em doses maiores do que as aprovadas, via de aplicação não aprovada, para tratamento de outras doenças ou ainda em outras espécies de animais que não aprovadas. Athanassopoulou et al. (2004) descreveram que esta prática ocorre, por exemplo, pela extrapolação dos tratamentos aprovados em doenças de salmonídeos para outras espécies em outras doenças. No Brasil, como em outros países, esta prática é rotineira. Sabendo dos efeitos deletérios de grande parte das drogas usadas na

aquicultura, o uso “off-label” representa um risco ainda maior ao meio ambiente, animais e humanos.

### **2.2.2. Fitoterápicos: tratamento alternativo**

Fitoterápicos, por definição, são produtos obtidos de plantas medicinais, ou seus derivados, com finalidade profilática, curativa ou paliativa (Brasil, 2011). As plantas conhecidas como medicinais apresentam ampla atividade antiparasitária, antibacteriana e antifúngica comprovada por estudos científicos em animais e humanos (Silva e Fernandes-Júnior, 2010). Apesar dos fitoterápicos terem sido usados como terapia em doenças de humanos há séculos, apenas recentemente tem sido discutido seu potencial para uso na aquicultura. Muito disso se deve à procura por novos produtos, substitutos aos medicamentos utilizados e que tem impacto direto no ambiente aquático.

Com relação às propriedades antimicrobianas das substâncias derivadas das plantas, estudos sobre o controle das infestações parasitárias de humanos e animais, incluindo os peixes têm sido estimulados (Abd El-Galil e Aboelhadid, 2012). Seu emprego na piscicultura pode contribuir com a redução da utilização de quimioterápicos parasiticidas, proporcionando maior sustentabilidade à produção de peixes, com diminuição dos riscos ambientais, ao passo que pode tratar doenças em lotes de peixes evitando mortalidades e, conseqüentemente, perdas econômicas. Há alguns anos, os fitoterápicos vêm sendo estudados no tratamento de alguns parasitos de peixes (Ekanem et al., 2004a,b; Steverding et al., 2005; Chitmanat et al., 2005), ganhando destaque nos últimos anos com a publicação de inúmeros trabalhos em importantes periódicos da área.

A principal forma de tratamento das parasitoses é por meio de banhos em água contendo o fitoterápico. Estudando o potencial antiparasitário de plantas medicinais Ling et al. (2013) definiram que o extrato metanólico de *Psoralea corylifolia* foi efetivo contra todos



as fases de vida livre de *I. multifiliis* quando usado na forma de banho durante 24 horas na concentração de 5 mg/L, e Lu et al. (2012) observaram 100% de eficácia dos extratos de *Dryopteris crassirhizoma*, *Kochia scoparia* e *Polygala tenuifolia* contra *Dactylogyrus intermedius* depois de 24 horas de exposição nas concentrações de 60 mg/L, 60 mg/L e 500 mg/L respectivamente, sendo considerados potenciais terapêuticos no controle desta parasitose. Foi realizada uma extensa busca sobre os trabalhos utilizando fitoterápicos no tratamento de parasitoses em peixes (Tabela 1) e os dados estão dispostos na forma de tabela, que poderá ajudar futuros pesquisadores na escolha de fitoterápicos, visto que há uma grande diversidade de tipos, metodologias e patógenos alvos descritos, dificultando sua comparação.

Tabela 1. Fitoterápicos com maiores potenciais para uso em aquicultura no tratamento de enfermidades parasitárias.

Parasito	Hospedeiro	Fitoterápico		Tratamento mais eficaz			Resultado	Autores
		Tipo	Planta	Via	Período	Concentração		
<i>Argulus</i> spp.	<i>Carassius auratus</i>	Princípio ativo piperina	<i>Piper longum</i>	Água	48h	9,0 mg/L	100% de eficácia	Kumar et al. (2012)
<i>Dactylogyrus intermedius</i>	<i>Carassius auratus</i>	Compostos ativos isolados: "osthol" e "isopimpinellin"	<i>Fructus cnidii</i>	Água	48h	"Osthol" (1,6 mg/L) "isopimpinellin" (9,5 mg/L)	100% de eficácia	Wang et al. (2008)
<i>Dactylogyrus intermedius</i>	<i>Carassius auratus</i>	Extrato metanólico	<i>Semen aesculi</i>	Água	48h	10 mg/L	100% de eficácia CE50= 5.23 mg/L CE90= 7.33 mg/L	Liu et al. (2010)
		Extrato aquoso				12 mg/L	100% de eficácia CE50 = 6.48 mg/L CE90 = 12.29 mg/L	
<i>Dactylogyrus intermedius</i>	<i>Carassius auratus</i>	Compostos ativos isolados: "dioscin" e "polyphyllin D"	<i>Paris polyphylla</i>	Água	48h	"Dioscin" EC50=0,44 mg/L e "Polyphyllin" D" EC50= 0,70 mg/L	Ambos apresentaram eficácia e o composto "dioscin" mostrou menor CE50	Wang et al. (2010a)
<i>Dactylogyrus intermedius</i>	<i>Carassius auratus</i>	Compostos ativos isolados: "trillin" e "gracillin"	<i>Dioscorea zingiberensis</i>	Água	48h	0,9 mg/L	Ambos apresentaram atividade antiparasitária	Wang et al. (2010b)
<i>Dactylogyrus intermedius</i>	<i>Carassius auratus</i>	Composto ativo isolado: "sanguinarine"	<i>Macleaya microcarpa</i>	Água	48h	0,7 mg/L	100% de eficácia	Wang et al. (2010c)

Tabela 1. Continuação.

Parasito	Hospedeiro	Fitoterápico		Tratamento mais eficaz			Resultado	Autores
		Tipo	Planta	Via	Período	Concentração		
<i>Dactylogyrus intermedius</i>	<i>Ctenopharyngo don idella</i>	Composto ativo isolado: "chelerythrine"	<i>Chelidonium majus</i>	Água	48h	1,60 mg/L	100% de eficácia	Li et al. (2011)
<i>Dactylogyrus intermedius</i>	<i>Carassius auratus</i>	Compostos ativos isolados: "bruceine A" e "bruceine D"	<i>Brucea javanica</i>	Água	48h	1 mg/L	Bruceine A= 97% de eficácia Bruceine D= 91.2% de eficácia	Wang et al. (2011b)
<i>Dactylogyrus intermedius</i>	<i>Carassius auratus</i>	Composto ativo isolado: "osthole"	<i>Radix angelicae pubescentis</i>	Água	48h	1,6 mg/L	100% de eficácia	Wang et al. (2011a)
<i>Dactylogyrus intermedius</i>	<i>Carassius auratus</i>	Extrato metanólico	<i>Radix Bupleuri chinensis</i>	Água	48h	10 mg/L	100% de eficácia CE50 = 3.5 mg/L e CE90 = 6.9 mg/L	Wu et al. (2011)
<i>Dactylogyrus intermedius</i>	<i>Carassius auratus</i>	Extrato aquoso Extrato metanólico	<i>Cinnamomum cassia</i>	Água	48h	30 mg/L 40 mg/L	100% de eficácia CE50 = 13.2 mg/L 100% de eficácia CE50 = 12.3 mg/L	Ji et al. (2012)
<i>Dactylogyrus intermedius</i>	<i>Carassius auratus</i>	Extrato metanólico	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Água	48h	60 mg/L	100% de eficácia	Lu et al., (2012)
<i>Gyrodactylus elegans</i> e <i>Dactylogyrus extensus</i>	<i>Carassius auratus</i>	Extrato metanólico	<i>Piper guineense</i>	Água	96h	1,5 mg/L	Efetivos contra os parasitos e mortalidade mínima do hospedeiro (15%)	Ekanem et al. (2004b)

Tabela 1. Continuação.

Parasito	Hospedeiro	Fitoterápico		Tratamento mais eficaz			Resultado	Autores
		Tipo	Planta	Via	Período	Concentração		
<i>Gyrodactylus turnbulli</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	Liofilizado em pó	<i>Allium sativum</i>	Água	Aplicação única	0,03 mg/L	95% de eficácia	Schelkle et al. (2013)
<i>Gyrodactylus</i> spp.	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Óleo essencial	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Água	48h	30 ppmv	90% de eficácia	Steverding et al. (2005)
Monogenea	<i>Heterobranchus longifilis</i>	Extrato etanólico	<i>Artemisia annua</i>	Água	1h	200 mg/L	85% mortalidade dos parasitas.	Ekanem e Brisibe (2010)
<i>Ichthyobodo necator</i>	<i>Oncorhynchus keta</i> e <i>Oncorhynchus masou</i>	Composto ativo isolado: "-epigallocatechin gallate"	<i>Camellia sinensis</i>	Água	5 min.	0,9 %	Eliminou 100% do parasita.	Suzuki et al. (2006)
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	<i>Carassius auratus</i>	Extrato metanólico	<i>Mucuna pruriens</i>	Água	72h	200 mg/L	Eficácia 92% (pele) e 91% (brânquia) Diminuiu 45% de mortalidade	Ekanem et al. (2004a)
		Extrato petróleo-éter	<i>Carica papaya</i>		96h	250 mg/L	Eficácia 92% (pele) Diminuiu 30% de mortalidade	
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Composto ativo isolado: sanguinarine	<i>Macleaya cordata</i>	Água	48h	0,9 mg/L	Redução de 96,8% do parasito na brânquia	Yao et al. (2010)

Tabela 1. Continuação.

Parasito	Hospedeiro	Fitoterápico		Tratamento mais eficaz			Resultado	Autores
		Tipo	Planta	Via	Período	Concentração		
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	<i>Squaliobarbus curriculus</i>	Compostos ativos isolados: dihydrosanguinarine e dihydrochelerythrine	<i>Macleaya microcarpa</i>	Água	48h	CE50: dihydrosanguinarine (5,18 mg/L) e dihydrochelerythrine (9,43 mg/L)	Ambos compostos são efetivos contra o <i>I. multifiliis</i>	Yao et al. (2011a)
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	<i>Carassius auratus</i>	Extrato aquoso	<i>Capsicum frutescens</i>	Água	4h	1:32 e 1:64 (v:v)	Mais de 70% de mortalidade dos parasitas.	Ling et al. (2012)
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	<i>Carassius auratus</i>	Extrato metanólico	<i>Magnolia officinalis</i> e <i>Sophora alopecuroides</i>	Água	1h	<i>M. officinalis</i> (20 mg/L) e <i>S. alopecuroides</i> (320 mg/L)	100% de mortalidade de tomonte	Yi et al. (2012)
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Composto isolado: "pentagalloylglucose"	<i>Galla chinensis</i>	Água	10 dias	20 mg/L	93.3% de sobrevivência dos bagres infectados	Zhang et al. (2013)
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	<i>Carassius auratus</i>	Compostos ativos isolados: "chelerythrine" e "chloroxylonine"	<i>Toddalia asiatica</i>	Água	72h	1.8 mg/L "chelerythrine" e 8 mg/L "chloroxylonine"	Diminuição significativa do número de parasitas no hospedeiro	Shan et al. (2014)
<i>Myxobolus</i> sp.	<i>Diplodus puntazzo</i>	Óleo essencial	<i>Origanum minutiflorum</i>	Ração	35 dias	8 ml/5kg de biomassa	Redução da prevalência e intensidade infestação	Karagouni et al. (2005)

Tabela 1. Continuação.

Parasito	Hospedeiro	Fitoterápico		Tratamento mais eficaz			Resultado	Autores
		Tipo	Planta	Via	Período	Concentração		
<i>Neobenedenia</i> sp.	<i>Lates calcarifer</i>	Princípio ativo alicina	<i>Allium sativum</i>	Água	1h	15,2 µl/L	Reduziu significativamente a eclosão e longevidade do oncomiracídeo	Militz et al. (2013)
<i>Pseudodactylogyrus</i>	<i>Anguilla anguilla</i>	Compostos isolados: ácido ginkgólico C13:0 e C15:1	<i>Ginkgo biloba</i>	Água	48h	C13:0 (2,5 mg/L) e C15:1 (6,0 mg/L)	100% remoção dos parasitas	Wang et al. (2009)
<i>Trichodina</i> sp.	<i>Parabramis pekinensis</i>	Compostos ativos isolados: "chelidonine", "chelerythrine" e "sanguinarine"	<i>Chelidonium majus</i>	Água	48 h	"chelidonine" (1,0 mg/L) "chelerythrine" (0,8 mg/L) "sanguinarine" (0,7 mg/L)	100% de eficácia	Yao et al. (2011b)
<i>Trichodina</i> sp.	<i>Oreochromis niloticus</i>	Extrato aquoso	<i>Camellia sinensis</i>	Água	5 min	0,9 %	Reduziu 95% dos parasitas da pele e nadadeiras	El-Deen (2010)
<i>Trichodina</i> sp. e <i>Gyrodactylus</i> sp.	<i>Oreochromis niloticus</i>	Dentes esmagados	<i>Allium sativum</i>	Água	indefinido	300 mg/L	Eliminou 68% do parasito	Abd El-Galil e Aboelhadi (2012)
<i>Uronema</i> sp.	<i>Pampus argenteus</i>	Óleo essencial	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Água	30 min./dia durante 5 dias	20 ppm	100% de eficácia Cura das lesões na pele	Al-Yaqout e Azad (2010)

Observa-se na Tabela 1, que o uso de tratamentos fitoterápicos vem sendo largamente estudados contra os parasitos *I. multifiliis* e monogenéticos. Isso se deve principalmente à grande importância destas parasitoses na aquicultura mundial e à falta de tratamentos seguros, informações estas, discutidas nesta revisão.

Os fitoterápicos também apresentam atividade antibacteriana contra patógenos humanos (Ushimaru et al., 2012) e animais (Dal-Pozzo et al., 2011), e a substituição dos antimicrobianos atuais por produtos fitoterápicos na aquicultura não é utopia, pois diversas plantas medicinais apresentaram atividade contra importantes bactérias patogênicas de peixes, como *A. hydrophila* (Muniruzzaman e Chowdhury, 2008; Harikrishnan et al., 2009; Harikrishnan et al., 2010c), *S. iniae* (Abutbul et al., 2004; Zilberget et al., 2010), *Streptococcus agalactiae* (Zilberget et al., 2010), *Flavobacterium columnare* (Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn, 2010), *Pseudomonas fluorescens* e *Edwardsiella tarda* (Muniruzzaman e Chowdhury, 2008). Existe preocupação com o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos e isso se deve principalmente ao uso indiscriminado e sem conhecimento na aquicultura (Cabello, 2006), enquanto que a capacidade dos fitoterápicos causarem resistência bacteriana é baixa (Kulkarni et al., 2013). A Tabela 2 mostra uma revisão dos principais fitoterápicos utilizados no tratamento de bacterioses de peixes.

Tabela 2. Fitoterápicos estudados em aquicultura no tratamento de enfermidades bacterianas.

Bactéria	Hospedeiro	Fitoterápico		Tratamento mais eficaz			Resultado	Autores
		Tipo	Planta	Via	Período	Concentração		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Channa punctatus</i>	Extrato acetato etílico	<i>Solanum nigrum</i>	Água	10 min/dia por 30 dias	1 g/L	Recuperação das lesões. Potencial tratamento de úlcera	Rajendiran et al. (2008)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Carassius auratus</i>	Extrato etanólico	<i>Azadirachta indica</i> + <i>Curcuma longa</i> + <i>Ocimum sanctum</i>	Administração oral	30 dias	2.5 g/Kg	0% de mortalidade dos peixes tratados.	Harikrishnan et al. (2009)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Extrato aquoso	<i>Azadirachta indica</i> + <i>Curcuma longa</i> + <i>Ocimum sanctum</i>	Administração oral	30 dias	0.1 % em 2 % PV	50% de mortalidade e 85% grupo controle	Harikrishnan et al. (2010a)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Carassius auratus</i>	Concocção	<i>Azadirachta indica</i> + <i>Ocimum sanctum</i> + <i>Curcuma longa</i>	Água	5 min/dia por 45 dias	1 %	6,7% de mortalidade e grupo controle 33.3%	Harikrishnan et al. (2010c)



Tabela 2. Continuação.

Bactéria	Hospedeiro	Fitoterápico		Tratamento mais eficaz			Resultado	Autores
		Tipo	Planta	Via	Período	Concentração		
<i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Barbodes gonionotus</i>	Extrato do bulbo	<i>Allium sativum</i>	Administração oral	10 dias SID	40 % em 3 % PV	100% recuperação ( <i>Aeromonas hydrophila</i> ) e 90% recuperados ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	Muniruzzaman e Chowdhury (2008)
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Decocção	<i>Calotropis gigantea</i>	Administração oral	10 dias SID	62,5 % em 3 % PV	96,67% dos peixes doentes se recuperaram	Muniruzzaman e Chowdhury (2008)
<i>Flavobacterium columnare</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Extrato aquoso	<i>Centella asiatica</i>	Água	Único banho, 2 dias após desafio	100 mg/L	0% de mortalidade dos peixes tratados.	Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2010)

As formas mais comuns de administração dos fitoterápicos no tratamento de bacterioses são por imersão ou via oral. Devido ao grande número de estudos, tipos de fitoterápicos e diferentes formas de tratamento, a comparação entre os dados da literatura é dificultada. Esta tabela de revisão pode ajudar no desenvolvimento de futuras pesquisas na área de tratamentos alternativos contra bacterioses de peixes.

Também foram revisados estudos sobre os efeitos dos fitoterápicos no tratamento de doenças causadas por fungos em aquicultura. O uso do extrato de eucalipto a 100 mg/L mostrou significativa inibição do crescimento de fungo e alta taxa de eclosão de ovos de *Rutilus frisii* (Najafi e Zamini, 2013). O uso do extrato de *Radix sanguisorbae* foi considerado promissor no tratamento de ovos infectados experimentalmente com *Saprolegnia australis* (Cao et al., 2013). Dados de trabalhos envolvendo o tratamento de doenças fúngicas em aquicultura auxiliam futuros pesquisadores com interesse nesta área (Tabela 3).

Tabela 3. Fitoterápicos estudados em aquicultura no tratamento de enfermidades fúngicas.

Fungos	Hospedeiro	Fitoterápico		Tratamento mais eficaz			Resultado	Autores
		Tipo	Planta	Via	Período	Concentração		
<i>Aphanomyces invadans</i>	<i>Cirrhina mrigala</i>	Extrato etanólico	<i>Azadirachta indica</i>	Administração oral	30 dias	0.2 %	Sem efeito sobre parâmetros imunológicos. Efeitos em valores hematológicos e bioquímicos.	Harikrishnan et al. (2010b)
<i>Aphanomyces invadans</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Extrato aquoso	<i>Azadirachta indica</i>	Água	5 min/dia por 24 dias	1 %	Desaparecimento completo das lesões após 36 dias do tratamento.	Harikrishnan et al. (2005)
<i>Saprolegnia australis</i>	Ovos de <i>Carassius gibelio</i>	Extrato aquoso	<i>Radix sanguisorbae</i>	Água	Banho único, com análise em 5 dias	1280 mg/L	Sobrevivência relativa=88%	Cao et al. (2013)
Fungo não especificado	Ovos de <i>Rutilus frisii</i>	Óleo essencial	<i>Eucalyptus</i> Spp	Água	1h/dia por 3 dias	100 mg/L.	Alta taxa de eclosão dos ovos tratados e significante inibição do crescimento do fungo.	Najafi e Zamini (2013)

### 2.2.3. Óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* e *Mentha piperita*

Os óleos essenciais são compostos complexos voláteis caracterizados por forte odor sendo formados a partir de plantas aromáticas, como metabólitos secundários. São líquidos, límpidos e podem ser sintetizados a partir de qualquer parte da planta. Os métodos para a extração de óleos essenciais podem incluir os usos de dióxido de carbono líquido ou microondas, e, principalmente, de baixa ou alta pressão empregando destilação água ou vapor quente fervente (Bakkali et al., 2008).

Os óleos essenciais de plantas (mistura complexa de diferentes compostos aromáticos) estão entre os principais compostos naturais a serem estudados em peixes, pela vasta atividade antimicrobiana já descrita de seus componentes (Lang e Buchbauer, 2012). Além disso, são biodegradáveis e devido a seus multi componentes naturais são menos propensos a causar o desenvolvimento de resistência bacteriana (Kulkarni et al., 2013).

Seu efeito citotóxico é caracterizado por ser lipofílico, desta forma, os óleos essenciais ultrapassam a parede celular e membrana citoplasmática, podendo afetar a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídio, causando a permeabilização da célula. Em bactérias, a permeabilização das membranas está associada à perda de íons e de redução do potencial de membrana, colapso da bomba de próton e ao esgotamento do pool de ATP (Bakkali et al., 2008).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (família Myrtaceae), planta nativa da Austrália, tem sido usado como medicamento antisséptico por décadas (Thomsen et al., 2011). Na literatura esta planta pode ser encontrada com o nome de “árvore de chá” ou

“tea tree”. Seu principal constituinte, terpineol é responsável por sua ampla atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica e antiparasitária (Carson et al., 2006).

A atividade bactericida do óleo essencial de *M. alternifolia* é atribuída a efeitos não específicos na membrana das bactérias (Cox et al., 2000; Carson et al., 2002). De fato, os danos causados pelos óleos essenciais de plantas sobre as membranas dos patógenos eucariontes são diversificados, sendo que dificilmente eles atuam em sítios específicos (Bakkali et al., 2008).

Com relação à atividade parasiticida, *M. alternifolia* reduziu em 50% o crescimento dos protozoários *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* (Mikus et al., 2000), e matou todos os indivíduos de *Trichomonas vaginalis* (Viollon et al., 1996). A atividade anti-inflamatória do óleo dessa planta (Carson et al., 2006), e sua eficácia como inseticida e repelente também já foram estudadas (Callander e James, 2012).

Estudando doenças de peixes, Campbell et al. (2001) descreveram que a atividade de zoósporo de *Aphanomyces invadans* cessou após 1 hora de exposição a 20 ppm do óleo essencial de *M. alternifolia*. Steverding et al. (2005) registraram a eficácia deste óleo essencial contra *Gyrodactylus* spp., concluindo que este é um produto natural com potencial para ser uma alternativa ao uso recorrente de quimioterápicos. Al-Yaqout e Azad (2010) estudaram os efeitos de oito óleos essenciais de plantas contra *Uronema* sp., entre eles o óleo essencial de *M. alternifolia*. Este fitoterápico foi o mais eficaz, tratando a doença causada por este parasito em *Pampus argenteus*, em banhos diários de 30 minutos durante cinco dias na concentração de 20 ppm. Não foram encontrados outros registros deste óleo essencial no tratamento de doenças de peixes.

O óleo essencial de *Lavandula angustifolia* tem como principais constituintes o linalol, acetato de linalilo, terpineol-4-ol, 1,8-cineol, B-ocimeno e cânfora. Sua constituição provê atividade contra diversas espécies de bactérias, fungos e ácaros

(Cavanagh e Wilkinson, 2002), inclusive contra bactérias resistentes a antibióticos (Nelson, 1997). Além disso, sua eficácia como pesticida também foi relatada (Cavanagh e Wilkinson, 2002). O óleo essencial de *L. angustifolia* se mostrou eficaz em matar larvas de mosca *Cephalopina titillator*, apresentando resultados semelhantes à doramectina, no entanto, esta droga não pode ser usada em animais em lactação, por isso a *L. angustifolia* poderia ser escolhida no tratamento da miíase (Khater et al., 2013). Moon et al. (2006), empregando ensaios *in vitro*, observaram atividade antiparasitária da *L. angustifolia* contra dois protozoários de humano (*Giardia duodenalis* e *Trichomonas vaginalis*) e um protozoário de peixe (*Hexamita inflata*). A concentração de 1% e 0,5% de óleo de *L. angustifolia* matou 100% de *H. inflata* após 30 minutos de exposição. Nesta revisão, não foram encontrados dados adicionais deste fitoterápico sobre outros patógenos de peixes, por isso seu teste se faz necessário.

*Mentha piperita*, comumente chamada hortelã pimenta, é uma espécie do gênero *Mentha* (Família Lamiaceae), que inclui 20 espécies com grande dispersão mundial. Plantas da Família Lamiaceae são ricas em polifenólicos e um grande número deles é conhecido por suas propriedades antimicrobianas (Oumzil et al., 2002). *M. piperita* é um terapêutico usado no tratamento de diversos sinais clínicos e doenças, incluindo parasitoses. Vidal et al. (2007) demonstraram que, além de não ocorrer efeitos deletérios contra células do intestino do hospedeiro, o extrato de *M. piperita* demonstrou atividade anti-trofozoítos de *Giardia duodenalis* (syn. *G. lamblia*), enquanto Dua et al. (2011) mostraram atividade deste fitoterápico contra *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Recentemente, Carvalho et al. (2012) concluíram que *M. piperita* é eficaz contra nematoide *Haemonchus contortus* e Khater (2013) descreveu que o óleo essencial desta planta foi tão eficaz quanto a ivermectina no tratamento de larvas de mosca *C. titillator*,

causadora de miíase, se mostrando mais seguro do que a ivermectina por representar menor risco ambiental.

O óleo essencial de *M. piperita* mostrou eficácia *in vitro* contra *Heterobothrium okamotoi*, um monogenético parasito de peixe, na concentração de 80 mg/L, porém não mostrou eficácia contra o parasito quando incluído na ração (Hirazawa et al., 2010). Em extensa revisão, não foram encontrados registros da eficácia deste óleo essencial contra outras parasitoses de peixes.

De acordo com esta revisão, os três fitoterápicos apresentados se mostraram com extensa atividade antimicrobiana, incluindo atividade contra parasitos protozoários de humanos ou animais. A revisão mostrou que os óleos essenciais de plantas não são específicos, sendo que sua ação tóxica sobre as células pouco depende do microrganismo patógeno alvo, se eles são eucariontes. Por isso, o uso dessas substâncias contra protozoários de peixes é promissor. Inúmeros fitoterápicos têm se mostrado efetivos no tratamento da ictiofitiríase, no entanto pouco se sabe sobre os efeitos dos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *L. angustifolia* e *M. piperita* em patógenos de peixes, não sendo encontrados estudos de seu efeito antiparasitário contra *I. multifiliis*.

### 3. REFERÊNCIAS

- Abd El-Galil MA, Aboelhadid SM. 2012. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. *Vet Parasitol*, 185(2), 57-63.
- Abutbul S, Golan-Goldhirsh A, Barazani O, Zilberg D. 2004. Use of *Rosmarinus officinalis* a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 238, 97–105.
- Akoll P, Konecny R, Mwanja WW, Schiemer F. 2012. Risk assessment of parasitic helminths on cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.). *Aquaculture*, 356, 123-127.
- Albert V, Ransangan J. 2013. Antibacterial potential of plant crude extracts against Gram negative fish bacterial pathogens. *Int J Res Pharm Biosci*, 3(2), 21-27
- Al-Yaqout A, Azad IS. 2010. Antiparasitic Effects of Some Essential Oils on the Scuticociliate, *Uronema* sp. *Res J Biotechnol*, 5(4), 20-25.
- Athanassopoulou F, Karagouni E, Dotsika E, Ragias V, Tavla J, Christofilloyanis P, Vatsos I. 2004. Efficacy and toxicity of orally administrated anti-coccidial drugs for innovative treatments of *Myxobolus* sp. infection in *Puntazzo puntazzo*. *Dis Aquat Org*, 62, 217–226.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol*, 46(2), 446-475.
- Bisharyan Y, Chen Q, Hossain MM, Papoyan A, Clark TG. 2003. Cadimun effect on *Ichthyophthirius*: evidence for metal-sequestration in fish tissues following administration of recombinant vaccines. *Parasitol*, 126, 87–93.



- Brasil. 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 126p.
- Buchmann K, Jensen PB, Kruse KD. 2003. Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: in vitro experiments. North Am J Aquacult, 65(1), 21-24.
- Burka JF, Hammell KL, Horsberg TE, Johnson GR, Rainnie DJ, Speare DJ. 1997. Drugs in salmonid aquaculture – A review. J Vet Pharm Ther, 20, 333–349.
- Burrige L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K. 2010. Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture, 306(1), 7-23.
- Cabello FC. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiol, 8(7), 1137-1144.
- Callander JT, James PJ. 2012. Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. Vet Parasitol, 184, 271-278.
- Campbell RE, Lilley JH, Panyawachira V, Kanchanakhan S. 2001. In vitro screening of novel treatments for *Aphanomyces invadans*. Aquacult Res, 32(3), 223-233.
- Cao H, Ou R, Li G, Yang X, Zheng W, Lu L. 2013. *Saprolegnia australis* RF Elliott 1968 infection in Prussian carp *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) eggs and its control with herb extracts. J Appl Ichthyol, 30(1), 145-150.
- Carson CF, Hammer KA, Riley TV. 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clin Microbiol Rev, 19, 50–62.

- Carson CF, Mee BJ, Riley TV. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 1914–1920.
- Carvalho CO, Chagas ACS, Cotinguiba F, Furlan M, Brito LG, Chaves FCM, Stephan MP, Bizzo HR, Amarante AFT. 2012. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Vet Parasitol*, 183, 260-268.
- Cavanagh HMA, Wilkinson JM. 2002. Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res*, 16, 301–308.
- Chitmanat C, Tongdonmuan K, Nunsong W. 2005. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Songklanakarin J Sci Technol*, 27(1), 359-64.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*, 88(1), 170-175.
- Dal Pozzo M, Viégas J, Santurio DF, Rossatto L, Soares IH, Alves SH, Costa MMD. 2011. Antimicrobial activities of essential oils extracted from spices against *Staphylococcus* spp. isolated from goat mastitis. *Ciência Rural*, 41(4), 667-672.
- Dua VK, Verma G, Agarwal DD, Kaiser M, Brun R. 2011. Antiprotozoal activities of traditional medicinal plants from the Garhwal region of North West Himalaya, India. *J Ethnopharm*, 136(1), 123-128.

- Earth Policy Institute. 2013. Farmed Fish Production Overtakes Beef. Disponível em <[http://www.earth-policy.org/plan\\_b\\_updates/2013/update114](http://www.earth-policy.org/plan_b_updates/2013/update114)>. Acessado em 12 de Janeiro de 2014.
- Ekanem AP, Obiekezie A, Kloas W, Knopf K. 2004a. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitol Res, 92, 361–366.
- Ekanem AP, Brisibe EA. 2010. Effects of ethanol extract of *Artemisia annua* L. against monogenean parasites of *Heterobranchus longifilis*. Parasitol Res, 106(5), 1135-1139.
- Ekanem AP, Wang M, Simon JE, Obiekezie AI, Morah F. 2004b. In vivo and in vitro activities of the seed extract of *Piper guineense* Schum. and Thonn. against skin and gill monogenean parasites of goldfish (*Carassius auratus auratus*). Phytother Res, 18(10), 793-797.
- El-Deen AEN. 2010. Green tea extract role in removing the *Trichodina* sp. on *Oreochromis niloticus* fry in the Egyptian fish hatcheries. Rep Opin, 2(8), 77-81.
- Elsayed EE, El Dien NE, Mahmoud MA. 2006. Ichthyophthiriasis: Various Fish Susceptibility or Presence of More than one Strain of the Parasite?. Nat Sci, 4(3), 5-13.
- Evans JJ, Klesius PH, Pasnik DJ, Shoemaker CA. 2007. Influence of natural *Trichodina* sp. parasitism on experimental *Streptococcus iniae* or *Streptococcus agalactiae* infection and survival of young channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Aquacult Res, 38, 664-667.

- Evenhuis JP, LaPatra SE, Marancik D. 2014. Early life stage rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mortalities due to *Flavobacterium columnare* in Idaho, USA. *Aquaculture*, 418, 126-131.
- Farmer BD, Fuller SA, Mitchell AJ, Straus DL, Bullard SA. 2013. Efficacy of Bath Treatments of Formalin and Copper Sulfate on Cultured White Bass, *Morone chrysops*, Concurrently Infected by *Onchocleidus mimus* and *Ichthyophthirius multifiliis*. *J World Aquacult Soc*, 44(2), 305-310.
- Franceschini L, Zago AC, Schalch SHC, Garcia F, Romera DM, Silva RJD. (2013). Parasitic infections of *Piaractus mesopotamicus* and hybrid (*P. mesopotamicus* x *Piaractus brachypomus*) cultured in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(3), 407-414.
- Garcia F, Romera DM, Gozi KS, Onaka EM, Fonseca FS, Schalch SH, Candeira PG, Guerra LOM, Carmo FJ, Carneiro DJ, Martins MIEG, Portella MC. 2013. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. *Aquaculture*, 410, 51-56.
- Garcia LDO, Becker AG, Cunha MA, Baldisserotto B, Copatti CE, Kochhann D. 2011. Effects of water pH and hardness on infection of silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings by *Ichthyophthirius multifiliis*. *J World Aquacult Soc*, 42(3), 399-405.
- Giesecker CM, Serfling SG, Reimschuessel R. 2006. Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 253(1), 120-129.
- Griffin MJ, Goodwin AE, Merry GE, Liles MR, Williams MA, Ware C, Waldbieser GC. 2013. Rapid quantitative detection of *Aeromonas hydrophila* strains associated with disease outbreaks in catfish aquaculture. *J Vet Diagn Investig*, 25(4), 473-481.

- Hanson TR, Shaik S, Coble KH, Edwards S, Miller JC. 2008. Identifying risk factors affecting weather-and disease-related losses in the US farm-raised catfish industry. *Agric Resour Econ Rev*, 37(1), 27-40.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Bhuvaneshwari R. 2005. Restorative effect of *Azadirachta indica* aqueous leaf extract dip treatment on haematological parameter changes in *Cyprinus carpio* (L.) experimentally infected with *Aphanomyces invadans* fungus. *J Appl Ichthyol*, 21, 410–413.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. 2009. Effect of chemotherapy, vaccines and immunostimulants on innate immunity of goldfish infected with *Aeromonas hydrophila*. *Dis Aquat Organ*, 88, 45–54.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. 2010a. Potential use of probiotic and triherbal extract-enriched diets to control *Aeromonas hydrophila* infection in carp. *Dis Aquat Organ*, 92, 41–49.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. 2010b. Supplementation diet containing probiotics, herbal and azadirachtin on hematological and biochemical changes in *Cirrhina mrigala* against *Aphanomyces invadans*. *Fish Aquacult J*, 4, 1–11.
- Harikrishnan R, Moon YG, Kim MC, Kim JS, Heo MS, Balasundaram C, Dharaneedharan S. 2010c. Phytotherapy of *Aeromonas hydrophila*-infected Goldfish, *Carassius auratus*. *J World Aquacult Soc*, 41(3), 391-401.
- Hawke JP, Kent M, Rogge M, Baumgartner W, Wiles J, Shelley J, Savolainen LC, Wagner R, Murray L, Peterson TS. 2013. Edwardsiellosis Caused by *Edwardsiella ictaluri* in Laboratory Populations of Zebrafish *Danio rerio*. *J Aquatic Anim Health*, 25(3), 171-183.

- Heinecke RD, Buchmann K. 2009. Control of *Ichthyophthirius multifiliis* using a combination of water filtration and sodium percarbonate: dose-response studies. *Aquaculture*, 288, 32–35.
- Henderson AL, Schmitt TC, Heinze TM, Cerniglia CE. 1997. Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 63, 4099–4101
- Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ. 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Food Saf*, 29, 1248–1253
- Hirazawa N, Ohtaka T, Hata K. 2000. Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture*, 188(1), 1-13.
- Jerônimo GT, Ventura AS, Pádua SB, Satake F, Ishikawa MM, Martins ML. 2013. Parasitofauna de cachara cultivado em tanque-rede no rio Paraguai. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(8), 1163-1166.[em português]
- Ji J, Lu C, Kang Y, Wang GX, Chen P. 2012. Screening of 42 medicinal plants for in vivo anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol Res*, 111(1), 97-104.
- Karagouni E, Athanassopoulou F, Lytra A, Komis C, Dotsika E. 2005. Antiparasitic and immunomodulatory effect of innovative treatments against *Myxobolus* sp. infection in *Diplodus puntazzo*. *Vet Parasitol*, 134, 215–228.
- Khan RA. 2009. Parasites causing disease in wild and cultured fish in Newfoundland. *Icelandic Agric Sci*, 22, 29-35.

- Khater HF. 2013. Bioactivities of some essential oils against the camel nasal botfly, *Cephalopina titillator*. Parasitol Res, 1-13.
- Khater HF, Ramadan MY, Mageid ADA. 2013. In vitro control of the camel nasal botfly, *Cephalopina titillator*, with doramectin, lavender, camphor, and onion oils. Parasitol Res, 112(7), 2503-2510.
- Kugel B, Hoffman RW, Fries A. 1990. Effect of low pH on the chorion of rainbow trout and Brown trout. J Fish Biol, 37, 301–310.
- Kulkarni RR, Pawar PV, Joseph MP, Akulwad AK, Sen A, Joshi SP. 2013. *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles sfttcephensi* and *Culex quinquefasciatus*. J Pest Sci, 86(4), 713-718.
- Kumar A, Raman RP, Kumar K, Pandey PK, Kumar V, Mohanty S, Kumar S. 2012. Antiparasitic efficacy of piperine against *Argulus* spp. on *Carassius auratus* (Linn. 1758): in vitro and in vivo study. Parasitol Res, 111(5), 2071-2076.
- Lang G, Buchbauer G. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. Flavour Fragr J, 27, 13–39.
- Li XL, Yao JY, Zhou ZM, Shen JY, Ru HS, Liu XL. 2011. Activity of the chelerythrine, a quaternary benzo [c] phenanthridine alkaloid from *Chelidonium majus* L. on *Dactylogyrus intermedius*. Parasitol Res, 109(1), 247-252.
- Ling F, Lu C, Tu X, Yi Y, Huang A, Zhang Q, Wang G. 2013. Antiprotozoal screening of traditional medicinal plants: evaluation of crude extract of *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish. Parasitol Res 112(6):2331-2340.

- Ling F, Wang JG, Liu QF, Li M, Ye LT, Gong XN. 2010. Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in goldfish (*Carassius auratus*) by potassium ferrate (VI) treatment. *Vet Parasitol*, 168(3), 212-216.
- Ling F, Wang JG, Lu C, Wang GX, Lui YH, Gong XN. 2012. Effects of aqueous extract of *Capsicum frutescens* (Solanaceae) against the fish ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitol Res*, 111(2), 841-848.
- Liu YT, Wang F, Wang GX, Han J, Wang Y, Wang YH. 2010. In vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Radix angelicae pubescentis*, *Fructus bruceae*, *Caulis spatholobi*, *Semen aesculi*, and *Semen pharbitidis* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol Res*, 106(5), 1233-1239.
- Longo SB, Clark B, York R. 2013. The globalization of ecologically intensive aquaculture (1984–2008). *J Environ Stud Sci*, 3(3), 297-305.
- Love DC, Rodman S, Neff RA, Nachman KE. 2011. Veterinary drug residues in seafood inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009. *Environ Sci Technol*, 45 (17), 7232–7240.
- Lu C, Zhang HY, Ji J, Wang GX. 2012. In vivo anthelmintic activity of *Dryopteris crassirhizoma*, *Kochia scoparia*, and *Polygala tenuifolia* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol Res*, 110(3), 1085-1090.
- Matthews RA. (2005). *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and Ichthyophthiriosis in Freshwater Teleosts. *Adv Parasitol*, 59, 159-241.



- Mikus J, Harkenthal M, Steverding D, Reichling J. 2000. In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Med*, 66, 366–368.
- Militz TA, Southgate PC, Carton AG, Hutson KS. 2013. Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. *J Fish Dis*, in press.
- Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HMA. 2006. Essential oils from Australian grown *Lavandula* spp.: a comparison of antibacterial activity. *Int J Aromath*, 16(1), 9–14.
- Müller MI, Adriano EA, Ceccarelli PS, da Silva MRM, Maia AAM, Ueta MT. 2013. Prevalence, intensity, and phylogenetic analysis of *Henneguya piaractus* and *Myxobolus* cf. *colossomatis* from farmed *Piaractus mesopotamicus* in Brazil. *Dis Aquatic Organ*, 107(2), 129.
- Muniruzzaman M, Chowdhury MBR. 2008. Evaluation of Medicinal Plants Through Fish Feed Against Bacterial Fish Disease. *Prog Agricult*, 19(2), 151-159.
- Najafi M, Zamini AA. 2013. Comparative Analysis of Antifungal Properties of *Zataria multiflora* Boiss, *Eucalyptus* spp Essence and Malachite Green on Eggs of Kutum (*Rutilus frisii Kutum*). *Adv Biol Res*, 7(5), 163-168.
- Nelson RRS. 1997. In vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother*, 40, 305-306.
- Noga EJ. 2010. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. Wiley-Blackwell, 536p.

- Osman HAM, El-Bana LF, Noor El Deen AE, Abd El-Hady OK. 2009. Investigations on white spots disease (Ichthyophthiriasis) in catfish (*Clarias gariepinus*) with special reference to the immune response. *Global Veterinaria*, 3 (2), 113–119.
- Ostrand SL, Glenn RA, Gannam AL, Hanson KC. 2012. Inhibitory Effects of Rosemary Oil on the In Vitro Growth of Six Common Finfish Pathogens. *North Am J Aquacult*, 74(2), 230-234.
- Oumzil H, Ghoulemi S, Rhajaoui M, Ilidrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M, Benjouad A. 2002. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother Res*, 16, 727–731.
- Pahor-Filho E, Miranda-Filho KC, Pereira Júnior J. 2012. Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and host. *Aquaculture*, 354, 111-116.
- Pantoja MF, Neves R, Dias RD, Marinho GB, Montagner D, Tavares-Dias M. 2012. Protozoan and metazoan parasites of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in Brazil. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1), 2812-2819.
- Park SB, Aoki T, Jung TS. 2012. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *Vet Res*, 43(1), 1-11.
- Pekmezci GZ, Yardimci B, Bolukbas CS, Beyhan YE, Umur S. 2011. Mortality due to heavy infestation of *Argulus foliaceus* (Linnaeus, 1758) (Branchiura) in pond-reared carp, *Cyprinus carpio* L., 1758 (Pisces). *Crustaceana*, 84(5-6), 5-6.
- Picón-Camacho SM, Marcos-Lopez M, Bron JE, Shinn AP. 2012a. An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius*

- multifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish. *Parasitol*, 139(2), 149-190.
- Picón-Camacho SM, Taylor NG, Bron JE, Guo FC, Shinn AP. 2012b. Effects of long duration, low dose bronopol exposure on the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora), parasitising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Vet Parasitol*, 186(3), 237-244.
- Pridgeon JW, Klesius PH. 2013. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* as potential vaccines by selecting for resistance to sparflaxacin. *Vaccine*, 31(24), 2705-2712.
- Raissy M, Sohrabi HR, Rashedi M, Ansari M. 2013. Investigation of a parasitic outbreak of *Lernaea cyprinacea* Linnaeus (Crustacea: Copepoda) in Cyprinid fish from *Choghakhor lagoon*. *Iranian J Fish Sci*, 12(3), 680-688.
- Rajendiran A, Natarjan E, Subramanian P. 2008. Control of *Aeromonas hydrophila* infection in spotted snakehead *Channa punctatus*, by *Solanum nigrum* L., a medicinal plant. *J World Aquacult Soc*, 39, 375–383.
- Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. 2010. Use of Asiatic pennywort *Centella asiatica* aqueous extract as a bath treatment to control columnaris in Nile tilapia. *J Aquatic Anim Health*, 22, 14–20.
- Rico A, Phu TM, Satapornvanit K, Min J, Shahabuddin AM, Henriksson PJ, Murray FJ, Little DC, Dalsgaard A, Van den Brink PJ. 2013. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, 412, 231-243.

- Rico A, Satapornvanit K, Haque MM, Min J, Nguyen PT, Telfer TC, Van den Brink PJ. 2012. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. *Rev Aquacult*, 4, 75–93.
- Rico A, Van den Brink PJ. 2014. Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. *Sci Total Environ*, 468, 630-641.
- Rintamäki-Kinnunen P, Rahkonen M, Mannermaa-Keränen AL, Suomalainen LR, Mykrä H, Valtonen ET. 2005. Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. *Dis Aquatic Organ*, 64, 69-76.
- Samad APA, Santoso U, Lee MC, Nan FH. 2013. Effects of dietary katuk (*Sauropus androgynus* L. Merr.) on growth, non-specific immune and diseases resistance against *Vibrio alginolyticus* infection in grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol*, in press.
- Sapkota A, Sapkota AR, Kucharski M, Burke J, McKenzie S, Walker P, Lawrence R. 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environ Int*, 34(8), 1215-1226.
- Schelkle B, Snellgrove D, Cable J. 2013. In vitro and in vivo efficacy of garlic compounds against *Gyrodactylus turnbulli* infecting the guppy (*Poecilia reticulata*). *Vet Parasitol*, 198(1), 96-101.
- Sebastião FA, Pilarski F, Lemos MVF. 2013. Composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by *Flavobacterium columnare* isolated from tropical fish in Brazil. *Braz J Microbiol*, in press.

- Shan XF, Kang YH, Bian Y, Gao YH, Wang WL, Qian AD. 2014. Isolation of active compounds from methanol extracts of *Toddalia asiatica* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). *Vet Parasitol*, 199(3), 250-254.
- Silva NCC, Fernandes-Júnior A. 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Trop Dis*, 16(3), 402-13.
- Skalli A, Castillo M, Andree KB, Tort L, Furones D, Gisbert E. 2013. The LPS derived from the cell walls of the Gram-negative bacteria *Pantoea agglomerans* stimulates growth and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture*, 416, 272-279.
- Soto E, McGovern-Hopkins K, Klinger-Bowen R, Fox BK, Brock J, Antonio N, Waal Z, Rushton S, Mill A, Tamaru CS. 2013. Prevalence of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in Cultured Tilapia on the Island of Oahu, Hawaii. *J Anim Health*, 25(2), 104-109.
- Srivastava S, Sinha R, Roy D. 2004. Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicol*, 66, 319–329.
- Steverding D, Morgan E, Tkaczynski P, Walder F, Tinsley R. 2005. Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp. infection of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Dis Aquatic Organ*, 66(1), 29.
- Sudova E, Machova J, Svobodova Z, Vesely T. 2007. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 52(12), 527-539.

- Suzuki K, Misaka N, Sakai DK. 2006. Efficacy of green tea extract on removal of the ectoparasitic flagellate *Ichthyobodo necator* from chum salmon, *Oncorhynchus keta*, and masu salmon, *O. masou*. *Aquaculture*, 259, 17–27.
- Tavechio WLG, Guidelli G, Portz L. 2009. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. *B Inst Pesca*, 35(2), 335 – 341.[em português]
- Thomsen PS, Jensen TM, Hammer KA, Carson CF, Mølgaard P, Riley TV. 2011. Survey of the Antimicrobial Activity of Commercially Available Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oil Products In Vitro. *J Altern Complement Med*, 17(9), 835–841.
- Tieman DM, Goodwin AE. 2001. Treatments of ich infestations in channel catfish evaluated under static and flow-through water conditions. *North Am J Aquacult*, 63, 293–299.
- U.S. Food and Drug Administration. 2012. Letter to Aquaculture Professionals. Disponível em <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/ProductSafetyInformation/ucm324048.htm>. Acessado em 12 de Janeiro de 2014.
- Ushimaru PI, Barbosa LN, Fernandes AAH, Di Stasi LC, Júnior AF. 2012. In vitro antibacterial activity of medicinal plant extracts against *Escherichia coli* strains from human clinical specimens and interactions with antimicrobial drugs. *Nat Prod Res*, 26(16), 1553-1557.
- Valladão GMR, Pádua SB, Gallani SU, Menezes-Filho RN, Dias-Neto J, Martins ML, Ishikawa MM, Pilarski F. 2013. *Paratrichodina africana* (Ciliophora): a pathogenic gill parasite in farmed Nile tilapia. *Vet Parasitol*, 197, 705-710.

- Vaseeharan B, Thaya R. 2013. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquacult Int*, in press.
- Vidal F, Vidal JC, Gadelha APR, Lopes CS, Coelho MGP, Monteiro-Leal LH. 2007. *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Exp Parasitol*, 115, 25–31.
- Viollon C, Mandin D, Chaumont JP. 1996. Activite´s antagonistes, in vitro, de quelques huiles essentielles et de compose´s naturels volatils vis a´ vis de la croissance de *Trichomonas vaginalis*. *Fitoterapia*, 67, 279–281.
- Wang GX, Han J, Zhao LW, Jiang DX, Liu YT, Liu XL. 2010a. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Paris polyphylla*. *Phytomed*, 17(14), 1102-1105.
- Wang GX, Jiang DX, Li J, Han J, Liu YT, Liu XL. 2010b. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* CH Wright against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol Res*, 107(6), 1365-1371.
- Wang GX, Jiang DX, Zhou Z, Zhao YK, Shen YH. 2009. In vivo assessment of anthelmintic efficacy of ginkgolic acids (C13: 0, C15: 1) on removal of *Pseudodactylogyrus* in European eel. *Aquaculture*, 297(1), 38-43.
- Wang GX, Zhou Z, Cheng C, Yao J, Yang Z. 2008. Osthol and isopimpinellin from *Fructus cnidii* for the control of *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Vet Parasitol*, 158(1), 144-151.
- Wang GX, Zhou Z, Jiang DX, Han J, Wang JF, Zhao LW, Li J. 2010c. In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde

- against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Vet Parasitol*, 171(3), 305-313.
- Wang KY, Yao L, Du YH, Xie JB, Huang JL, Yin ZQ. 2011a. Anthelmintic activity of the crude extracts, fractions, and osthole from *Radix angelicae pubescentis* against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish (*Carassius auratus*) in vivo. *Parasitology research*, 108(1), 195-200.
- Wang Y, Wu ZF, Wang GX, Wang F, Liu YT, Li FY, Han J. 2011b. In vivo anthelmintic activity of bruceine A and bruceine D from *Brucea javanica* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Vet Parasitol*, 177(1), 127-133.
- Wei JZ, Li H, Yu H. 2013. Ichthyophthiriasis: emphases on the epizootiology. *Lett Appl Microbiol*, 57(2), 91-101.
- Witeska M, Kondera E, Ługowska K. 2010. The effects of ichthyophthiriasis on some haematological parameters in common carp. *Turk J Vet Anim Sci*, 34, 267–271.
- Wu ZF, Zhu B, Wang Y, Lu C, Wang GX. (2011). In vivo evaluation of anthelmintic potential of medicinal plant extracts against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol Res*, 108(6), 1557-1563.
- Xu DH, Pridgeon JW, Klesius PH, Shoemaker CA. 2012a. Parasitism by protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* enhanced invasion of *Aeromonas hydrophila* in tissues of channel catfish. *Vet Parasitol*, 184, 101–107.
- Xu DH, Shoemaker CA, Klesius PH. 2012b. *Ichthyophthirius multifiliis* as a potential vector of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *FEMS Microbiol Lett*, 329, 160–167.



- Xu DH, Shoemaker CA, Martins ML, Pridgeon JW, Klesius PH. 2012c. Enhanced susceptibility of channel catfish to the bacterium *Edwardsiella ictaluri* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet Microbiol*, 158, 216–219.
- Xu DH, Shoemaker CA, Zhang Q, Klesius PH. 2012d. Naturally infected channel catfish (*Ictalurus punctatus*) concurrently transmit *Ichthyophthirius multifiliis* and *Edwardsiella ictaluri* to naïve channel catfish. *Aquaculture*, 376-379, 133-136.
- Xue-Gang H, Lei L, Cheng C, Kun H, Xian-Le Y, Gao-Xue W. 2013. In Vitro Screening of Chinese Medicinal Plants for Antifungal Activity against *Saprolegnia* sp. and *Achlya klebsiana*. *North Am J Aquacult*, 75(4), 468-473.
- Yao J, Zhou Z, Li X, Yin W, Ru H, Pan X, Hao G, Xu Y, Shen J. 2011a. Antiparasitic efficacy of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine from *Macleaya microcarpa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in richadsin (*Squaliobarbus curriculus*). *Vet Parasitol*, 183, 8–13.
- Yao JY, Li XL, Shen JY, Pan XY, Hao GJ, Xu Y, Ying WL, Ru HS, Liu XL. 2011b. Isolation of bioactive components from *Chelidonium majus* L. with activity against *Trichodina* sp. *Aquaculture*, 318(1), 235-238.
- Yao JY, Shen JY, Li XL, Xu Y, Hao GJ, Pan XY, Wang GX, Yin WL. 2010. Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Parasitol Res*, 107(5), 1035-1042.
- Yi Y, Lu C, Hu X, Ling F, Wang G. 2012. Antiprotozoal activity of medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol Res*, 111(4), 1771-1778.

Zhang D, Li A, Guo Y, Zhang Q, Chen X, Gong X. 2013. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* in diseased farmed tilapia in China. *Aquaculture*, 412, 64-69.

Zilberg D, Tal A, Froyman N, Abutbul S, Dudai N, Golan-Goldhirsh A. 2010. Dried leaves of *Rosmarinus officinalis* as a treatment for streptococcosis in tilapia. *J Fish Dis*, 33, 361–369.

## **CAPÍTULO 2**

### **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONTRA *Ichthyophthirius multifiliis* E CONTROLE DA ICTIOFITIRÍASE COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia***

*Artigo nas normas do periódico Parasitology Research*

## RESUMO

Neste estudo, foram avaliados o efeito antiparasitário *in vitro* dos óleos essenciais (OE) de *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* e *Mentha piperita* contra trofontes de *Ichthyophthirius multifiliis* e o efeito *in vivo* do OE de *M. alternifolia* no tratamento da ictiofitiríase. O teste *in vitro* foi composto pelos três OE, nas concentrações 57 µl/L, 114 µl/L, 227 µl/L e 455 µl/L, que foram avaliadas a cada 1 hora durante 4 horas em placas de cultura de células (96 poços). O tratamento *in vivo* da ictiofitiríase foi realizado em banho de 2 h/dia por 5 dias utilizando o OE de *M. alternifolia* (50 µl/L). Os resultados *in vitro* mostraram que os OE de *M. alternifolia*, *L. angustifolia* e *M. piperita* eliminaram, respectivamente, 80%, 66,34% e 68,52% de trofontes após 4 horas de exposição à menor concentração (57 µl/L), enquanto a maior concentração (455 µl/L) de todos OE eliminou 100% de trofontes após uma hora de exposição. No estudo *in vivo*, 56,33% de peixes severamente doentes pela ictiofitiríase sobreviveram quando tratados com OE de *M. alternifolia* (50 µl/L) e a eficácia anti-trofonte deste tratamento foi de 99,8% no tegumento e 98,8% na brânquia, enquanto todos os peixes do grupo não tratado morreram. Além disso, foi observado potencial efeito positivo do OE de *M. alternifolia* contra duas bactérias patogênicas oportunistas *Edwardsiella tarda* e *Citrobacter freundii*. Em conclusão, os OE de *M. alternifolia*, *L. angustifolia* e *M. piperita* foram considerados potenciais fitoterápicos contra *I. multifiliis* e o uso do OE de *M. alternifolia* em banho tratou caso grave de ictiofitiríase.

**Palavras-chave:** fitoterápico, plantas medicinais, extrato de planta, parasito, aquicultura, *Piaractus mesopotamicus*.

## ABSTRACT

In this study, were evaluated the *in vitro* anti-parasite effect of *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* and *Mentha piperita* essential oils (EO) against trophonts of *Ichthyophthirius multifiliis* and *in vivo* effect of *M. alternifolia* EO on the treatment of ichthyophthiriasis. The *in vitro* study was comprised by three EO at the concentrations of 57 µl/L, 114 µl/L, 227 µl/L and 455 µl/L, and was evaluated each hour during four hours using 96-well microtitre plate. The *in vivo* study was performed in 2 h/day bath treatment by 5 days with EO of *M. alternifolia* (50 µl/L). The *in vitro* results showed that *M. alternifolia*, *L. angustifolia* e *M. piperita* (EO) killed 80%, 66.34% and 68.52% of trophonts, respectively, after 4h exposure at the lower concentrations (57 µl/L), and the highest concentration (455 µl/L) of all the EO killed 100% of trophonts after 1h of exposure. At the *in vivo* study, 56.33% of the infected fish survived after immersion in *M. alternifolia* EO (50 µl/L). The anti-trophont efficacy was 99.8% and 98.8% in the tegument and gills, respectively, while control group showed 100% of mortality. Furthermore, there was a positive effect of *M. alternifolia* EO against two pathogenic bacteria *Edwardsiella tarda* and *Citrobacter freundii*. In conclusion, the EO *M. alternifolia*, *L. angustifolia* e *M. piperita* were considered as potential phytotherapics against *I. multifiliis* and the use of *M. alternifolia* EO in bath treated severe ichthyophthiriasis.

**Key-words:** phytotherapy, medicinal plants, herbal extract, parasite, aquaculture, *Piaractus mesopotamicus*.

## 1. INTRODUÇÃO

*Ichthyophthirius multifiliis* é um protozoário ciliado cosmopolita responsável por uma das principais doenças em peixes de água doce, a ictiofitiríase ou “doença dos pontos brancos”. Esta parasitose apresenta alta morbidade (Osman et al. 2009) e causa importantes perdas econômicas na produção de peixes (Buchmann et al. 2001). O ciclo de vida deste parasito pode ser dividido em fases de vida livre e uma fase parasitária (Matthews 2005). Os efeitos deletérios de *I. multifiliis* são causados principalmente pela fase parasitária chamada de trofante, que se alimenta e se desenvolve no tecido tegumentar e branquial do peixe (Ling et al. 2010), podendo culminar em morte do hospedeiro por comprometimento respiratório (Wei et al. 2013). As altas taxas de mortalidade estão associadas, principalmente, à falta de produtos terapêuticos adequados e registrados.

Alguns dos principais produtos utilizados no tratamento da ictiofitiríase são o verde malaquita (Srivastava et al. 2004), formalina, sulfato de cobre (Farmer et al. 2013) e permanganato de potássio (Rintamäki-Kinnunen et al. 2005). Devido aos efeitos altamente indesejáveis sobre o meio ambiente (Rico e Brink 2014), animais e humanos (Sapkota et al. 2008) o uso de alguns parasiticidas tem sido desencorajado. Além disso, fitoterápicos apresentam grande potencial como alternativa no tratamento de parasitoses em peixes (Abd El-Galil e Aboelhadid 2012).

O óleo essencial (OE) de *Melaleuca alternifolia* tem amplo efeito antisséptico (Thomsen et al. 2011), com atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitária (Carson et al. 2006), inseticida e repelente (Callander e James 2012). Em relação à atividade antiparasitária, este OE reduziu em 50% o crescimento dos protozoários *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* (Mikus et al. 2000) e eliminou todos indivíduos de *Trichomonas vaginalis* (Viollon et al. 1996), assim como

apresentou atividade contra *Gyrodactylus* spp. (Steверding et al. 2005). O OE de *Lavandula angustifolia* tem grande atividade contra bactérias, fungos, ácaros e pestes (Cavanagh e Wilkinson 2002). Sua atividade antiprotozoária foi descrita contra parasitos de humano *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* e um parasito de peixe *Hexamita inflata* (Moon et al. 2006). *Mentha piperita* é uma espécie da Família Lamiaceae que é composta por plantas ricas em polifenólicos e um grande número deles é conhecido por suas propriedades antimicrobianas (Oumzil et al. 2002). Este fitoterápico foi eficaz no controle de *Haemonchus contortus* (Carvalho et al. 2012) e mostrou atividade anti-trofozoíto de *G. duodenalis* (syn. *G. lamblia*) (Vidal et al. 2007).

Os óleos essenciais de plantas (OEP) são fitoterápicos promissores para uso em aquicultura, pois apresentam extensa atividade antimicrobiana em seus componentes. Neste estudo avaliou-se, *in vitro*, o efeito antiparasitário dos OE de *M. alternifolia*, *L. angustifolia* e *M. piperita* contra trofozoíto de *I. multifiliis* e a eficácia *in vivo* do OE de *M. alternifolia* no tratamento da ictiofitiríase.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### *2.1. Óleos essenciais de plantas (OEP)*

Os OE puros de *M. alternifolia*, *L. angustifolia* e *M. piperita* foram comprados na empresa Phytoterapica®. Análises por cromatografia gasosa foram realizadas para identificação e avaliação dos constituintes de cada óleo essencial. O sistema cromatográfico foi composto pelo GC-MS Agilent 6890N equipado com detector seletivo de massas HP 5975, injetor automático 7683B, coluna capilar HP-5 (30 x 0,25 mm; 0,25 µm) e controlado em modo Split. O injetor foi mantido a 220 °C e a coluna a 60 °C com temperatura crescente (3 °C/minuto) até 240 °C. A temperatura do detector

de massas foi de 250 °C. Os cromatogramas obtidos e os principais constituintes das amostras foram identificados a partir da biblioteca Nist do equipamento (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos componentes químicos dos óleos essenciais (OE) de *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* e *Mentha piperita*.

<i>Melaleuca alternifolia</i>		<i>Lavandula angustifolia</i>		<i>Mentha piperita</i>	
Componente	Área (%)	Componente	Área (%)	Componente	Área (%)
$\alpha$ -pineno	2,77	Eucaliptol	2,92	$\alpha$ -pineno	0,49
$\alpha$ -terpineno	11,14	$\beta$ -trans ocimeno	1,25	$\beta$ -Felandreno	0,34
p-cimeno	3,77	$\beta$ -cis ocimeno	1,26	$\beta$ -pineno	0,84
D-limoneno	1,89	Linalol	35,94	p-cimeno	0,31
Eucaliptol	2,05	Canfora	4,51	D-limoneno	1,81
$\gamma$ -terpineno	22,36	(-) borneol	4,19	eucaliptol	4,73
terpinoleno	3,46	1-terpinen-4-ol	0,78	Cis- $\beta$ -terpineol	0,44
1-terpinen-4-ol	44,6	$\alpha$ -terpineol	1,91	p-mentona	22,95
$\alpha$ -terpineol	5,5	Antranilato de linalila	45,44	Coeluição de picos	10,89
aromadendreno	1,27	Acetato de geranila	1,64	D-mentol	44,57
(+)-ledeno	< 0,80	cariofileno	1,73	L-mentol	0,73
aloaromadendreno	< 0,8			pulegona	1,54
$\beta$ -cadineno	0,81			piperitona	0,49
$\gamma$ -gurjuneno	< 0,80			Acetato de mentila	6,36
				cariofileno	2,51
				$\beta$ -cubebeno	1,01

## 2.2. Hospedeiro e parasitos

*Piaractus mesopotamicus* foi escolhido como hospedeiro modelo para este estudo, por ser uma espécie endêmica na região e frequentemente afetada por *I. multifiliis*. Os peixes *P. mesopotamicus* sadios (aproximadamente 5 cm) foram mantidos em aquários de 70 L com aeração constante e troca parcial (10%) de água a cada dois dias. Os peixes foram infestados experimentalmente com *I. multifiliis*, por coabitação, com peixes da mesma espécie naturalmente infestados. A coabitação é um dos métodos mais comuns na infestação experimental por *I. multifiliis* (Xu et al. 2007) e sua



efetividade foi observada pela visualização de sinais clínicos seguida de raspados do tegumento.

Os peixes apresentaram alta infestação parasitária, caracterizada pela presença de inúmeros pontos brancos sobre tegumento. Uma parte dos peixes teve o tegumento raspado para obtenção de parasitos para o teste *in vitro*, enquanto o restante foi utilizado posteriormente em outra infecção experimental para o teste *in vivo*.

Este estudo está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (Protocolo nº 017425/13).

### 2.3. Estudo *in vitro*

O efeito dos OE de *M. alternifolia*, *L. angustifolia* e *M. piperita* contra trofontes de *I. multifiliis* foi realizado seguindo metodologia descrita por Ekanem et al. (2004), com modificações no material de deposição dos parasitos, forma de exposição (quantidade e materiais) e no tempo final de avaliação de mortalidade de trofontes.

Foram elaboradas soluções estoques (20 ml) para a diluição dos OEP nas concentrações teste desejadas. Para produção das soluções estoques foi necessária a solubilização dos OE, que foi realizada misturando-o com o solubilizante dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich®) em solução de água deionizada (Gehaka® - DG300UF). A quantidade de DMSO em todas as concentrações foi duas vezes maior do que a quantidade de OE para garantia da homogeneidade da solução. As soluções estoque foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar com vedação batoque e tampa de rosca para preservação da qualidade da amostra. As concentrações iniciais dos OE nas soluções estoques foram de 625 µl/L, 1250 µl/L, 2500 µl/L e 5000 µl/L, sendo que a quantidade de DMSO misturada aos OE foi, respectivamente, 1250 µl, 2500 µl, 5000 µl e 10000 µl. Uma solução estoque com a maior quantidade de DMSO (10000 µl/L)

sem adição de OE também foi preparada e utilizada como um controle para o teste *in vitro*.

Os trofontes de *I. multifiliis* obtidos por raspados de tegumento dos peixes infestados mantidos em aquários (70 L) foram depositados diretamente em placa de petri contendo água (15 ml) do próprio tanque. A placa de petri foi colocada sobre um papel preto, facilitando a visualização dos trofontes a olho nu. Com auxílio de uma micropipeta, 100 µl de água contendo trofontes foram pipetados em 84 poços de placas de cultura de células (96 poços). Setenta e dois poços foram utilizados para três grupos de OE em quatro concentrações com seis repetições, enquanto que, doze poços foram utilizados para dois grupos controles (grupo controle exposto apenas ao DMSO e grupo controle não exposto a nenhuma substância com seis repetições cada).

A contagem basal de trofontes foi realizada por visualização microscópica (aumento de 40x) de todos os poços, fornecendo a média de 8 trofontes por poço. Posteriormente, 10 µl de cada solução estoque foram adicionados nos respectivos poços, completando 110 µl de solução. Portanto, os trofontes foram expostos às concentrações de OE finais de 57 µl/L, 114 µl/L, 227 µl/L e 455 µl/L, e a concentração final do grupo exposto apenas ao DMSO foi de 910 µl/L. Por fim, foram coletados dados de mortalidade (%) dos trofontes de *I. multifiliis* a cada 1 hora por 4 horas. O parasito foi considerado morto na ausência completa de motilidade ciliar. Esta etapa foi realizada com auxílio de microscópio óptico (aumento de 40x). Além disso, foi descrito o efeito dos OEP sobre a fase de vida livre teronte, observada em grande número nos poços do teste *in vitro*.

Uma média geral da mortalidade de trofontes nas 4 horas de exposição dos diferentes OE foi confeccionada para comparação de suas eficácias *in vitro*.

#### 2.4. Estudo *in vivo*

Alevinos de *P. mesopotamicus* (aproximadamente 10 cm), saudáveis, foram aclimatados em dois tanques de cimento de 400 L. Um dos tanques foi infestado experimentalmente com *I. multifiliis* para uso no teste *in vivo*, enquanto peixes saudáveis do outro tanque foram utilizados como controle sadio. A infecção experimental foi realizada por coabitação com peixes altamente parasitados que eram mantidos nos aquários de 70 L. Após o aparecimento de pontos brancos nos peixes infestados foram realizadas análises parasitológicas de cinco peixes a cada dois dias, até que fosse encontrada uma média de, pelo menos, duzentos trofontes parasitando tegumento e brânquia, caracterizando grave infestação parasitária (Carraschi et al. 2013).

Baseado nos resultados observados no estudo *in vitro* e na revisão de literatura o OE de *M. alternifolia* foi escolhido para teste *in vivo* no tratamento de ictiofitiríase experimental. O teste *in vivo* foi realizado em ambiente externo utilizando 12 tanques de cimento (50 L) com fluxo de água contínuo, infraestrutura similar à encontrada em pisciculturas de peixes jovens.

O teste *in vivo* foi composto por quatro grupos em triplicata, sendo o grupo 1 composto por peixes parasitados tratados com OE de *M. alternifolia*, grupo 2 por peixes parasitados expostos ao solvente (DMSO), grupo 3 por peixes parasitados não tratados e grupo 4 formado por peixes sadios. Os peixes infestados experimentalmente (>200 trofontes) e peixes sadios foram distribuídos, na densidade de cinco peixes/tanque, em tanques de cimento (50 L) preenchidos com 30 litros de água subterrânea com fluxo aberto. A fonte de água era a mesma para todos os tratamentos e os parâmetros de água foram mensurados (sonda multiparâmetros - YSI Professional Plus®) durante o período de teste *in vivo* (Tabela 2).

Tabela 2. Média dos parâmetros de água mensurados durante o teste *in vivo*.

Parâmetros	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Temperatura (°C)	19,38 ± 2,83	19,35 ± 2,81	19,20 ± 3,41	19,63 ± 2,90
pH	8,41 ± 0,16	8,36 ± 0,13	8,39 ± 0,17	8,48 ± 0,18
Condutividade (µS/cm)	149,63 ± 15,41	160,13 ± 10,24	145,70 ± 17,90	160,73 ± 10,71
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6,80 ± 0,37	6,63 ± 0,31	6,67 ± 0,64	6,60 ± 0,49

O tratamento (grupo 1) foi realizado em banhos de 2 horas por dia, durante 5 dias, na concentração de 50µl do OE *M. alternifolia* com 100 µl de DMSO por litro de água. O fluxo de água de todos os grupos foi interrompido durante as duas horas de tratamento e completamente aberto (vazão de 3 L/Min.) após este período. Em ensaios preliminares não foram observadas mortalidade de peixes expostos ao tratamento escolhido.

A mortalidade diária dos peixes, descrição de comportamento e sinais clínicos foram efetuados durante o período do teste. Para análise de eficácia anti-parasitária do OE de *M. alternifolia*, o número de parasitos encontrados no tegumento e brânquia de cinco peixes sobreviventes do grupo tratado foi comparado com o número de parasitos encontrados no tegumento e brânquia de cinco peixes analisados antes do teste (média de 200 trofontes/peixe).

A eficácia anti-parasitária foi calculada pela fórmula:  $EA = (A - D)/A \times 100$  onde *EA* é a eficácia anti-parasitária (%), *A* é a média de parasitos antes do tratamento e *D* é a média de parasitos pós-tratamento. As análises parasitárias foram realizadas por meio do raspado completo do tegumento e coleta de todos os arcos branquiais para contagem direta em microscopia óptica (aumento de 100x).

## 2.5. Diagnóstico de infecção bacteriana secundária

Durante o período de teste *in vivo* foram observados, em alguns peixes, do grupo 1, 2 e 3, sinais clínicos de despigmentação com lesão ulcerativa na pele seguida de morte do hospedeiro. Devido a suspeita da ocorrência de uma bacteriose de ocorrência natural e secundária à ictiofitiríase experimental, dois peixes não tratados (grupo 2 e 3) e dois peixes tratados (grupo 1) com OE de *M. alternifolia* recém-mortos foram congelados para identificação microbiológica. O rim e o baço, coletados assepticamente em fluxo laminar, foram incubados em meios de cultura ricos (líquido e sólido) seguindo protocolo de Pilarski et al. (2008) e incubados em duas temperaturas (25 °C e 30 °C) por 24 e 48 horas. Após descrição da morfologia das colônias e gram, os isolados foram submetidos a PCR de colônia. A identificação molecular foi realizada pelo método de Sheu et al. (2000), modificado por Sebastião et al. (dados não publicados).

## 2.6. Análise estatística

Na comparação entre a média geral dos três óleos essenciais estudados *in vitro* foi utilizado o procedimento para modelos mistos do programa Statistical Analysis System (SAS 2008 - versão 9.2). Os dados de sobrevivência *in vivo* foram analisados com o software R e expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparação das médias de sobrevivências, no qual as probabilidades iguais ou menores que 0,05 foram consideradas estatisticamente significantes.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Análise dos óleos essenciais

A análise de cromatográfica gasosa confirmou a identidade dos três OEP adquiridos. Nas identificações dos picos no cromatograma, o 1-terpinen-4-ol (44,60%),

$\gamma$ -terpineno (22,36%) e  $\alpha$ -terpineno (11,14%) foram os principais componentes do OE de *M. alternifolia*, enquanto Antranilato de linalila (45,44%) e Linalol (35,94%) foram os principais componentes do OE de *L. angustifolia*, e o D-mentol (44,57%) e p-mentona (22,95%) foram os principais componentes do OE de *M. piperita*.

### 3.2. Estudo *in vitro*

Os OE de *M. alternifolia*, *L. angustifolia* e *M. piperita* mostraram atividade *in vitro* contra trofontes de *I. multifiliis*. Não foram observadas mortalidades de trofontes no grupo controle e no grupo exposto ao DMSO, sendo descartada qualquer influência destes nos testes. O OE de *M. alternifolia* apresentou maior média de mortalidade de trofontes dentro das concentrações de 57  $\mu$ l/L, 114  $\mu$ l/L e 227  $\mu$ l/L (56,34%, 66,02%, 89,24% respectivamente), conseqüentemente apresentando maior média geral de eficácia anti-trofontes (77,90%) se comparada aos OE de *L. angustifolia* e *M. piperita* (73,83% e 73,22%, respectivamente), porém sem diferença estatística entre os três OE ( $p > 0,05$ ). Ocorreu aumento da mortalidade de trofontes de *I. multifiliis* conforme o aumento das concentrações utilizadas (Tabela 3) e quanto maior o tempo de exposição ( $p < 0,05$ ) em todos OE (Tabela 4).

Tabela 3. Mortalidade média (%) das quatro horas de contagem, de trofontes de *Ichthyophthirius multifiliis* expostos aos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* e *Mentha piperita* em quatro concentrações.

Óleo essencial	Concentração				Média total
	57 $\mu$ l/L	114 $\mu$ l/L	227 $\mu$ l/L	455 $\mu$ l/L	
<i>Melaleuca alternifolia</i>	56,34a	66,02b	89,24c	100,00d	77,90
<i>Lavandula angustifolia</i>	50,11a	59,31b	85,88c	100,00d	73,83
<i>Mentha piperita</i>	49,29a	59,40b	84,17c	100,00d	73,22
Média total	51,91	61,58	86,43	100	

As médias de mortalidade de trofontes a cada tempo de exposição foram dispostas na Tabela 4. Apesar de não ter sido observada diferença estatística na média

geral dos tratamentos, o OE de *M. alternifolia* causou maior mortalidade dos trofontes do que os OE de *L. angustifolia* e *M. piperita* na concentração de 57 µl/L com duas horas de exposição (54%, 45,62% e 45,16%, respectivamente) e com 4 horas de exposição (80%, 66,34% e 68,52%, respectivamente), além de maior mortalidade na concentração de 114 µl/L com 3 horas de exposição (87,14%, 70,50% e 72,14%, respectivamente) e com 4 horas de exposição (93,32%, 73,28 e 84,34%, respectivamente). As demais concentrações de OE, nos diferentes tempos de exposição, foram similares. Na maior concentração (455 µl/L) todos OE eliminaram 100% dos trofontes desde uma hora de exposição. Somente as concentrações de 227 µl/L e 455 µl/L foram efetivas em matar 100% de trofontes durante o teste. Os trofontes mortos apresentaram vacuolização e inchaço, culminando por vezes em lise do parasito. Os dois grupos controles não apresentaram influência sobre os trofontes, que se mantiveram em movimentação normal no período de 4 horas.

Tabela 4. Mortalidade (%) *in vitro* de trofontes de *Ichthyophthirius multifiliis* expostos aos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* e *Mentha piperita* em quatro concentrações durante quatro horas.

Óleo essencial	Tempo de exposição	Concentrações			
		57 µl/L	114 µl/L	227 µl/L	455 µl/L
<i>Melaleuca alternifolia</i>	1 h	22,00	25,26	60,80	100,00
	2 h	54,00	58,36	98,08	100,00
	3 h	69,34	87,14	98,08	100,00
	4 h	80,00	93,32	100,00	100,00
	Média total	56,34	66,02	89,24	100,00
<i>Lavandula angustifolia</i>	1 h	22,12	29,94	52,67	100,00
	2 h	45,62	63,55	90,83	100,00
	3 h	66,34	70,50	100,00	100,00
	4 h	66,34	73,28	100,00	100,00
	Média total	50,11	59,31	85,88	100,00
<i>Mentha piperita</i>	1 h	23,16	27,82	46,20	100,00

<i>Mentha piperita</i>	2 h	45,16	53,30	90,48	100,00
	3 h	60,30	72,14	100,00	100,00
	4 h	68,52	84,34	100,00	100,00
	Média total	49,29	59,40	84,17	100,00

Grande número de terontes (fase de vida livre do *I. multifiliis*) foi observado em movimento no início do teste *in vitro*, não sendo possível realizar sua contagem com a metodologia utilizada, porém após uma hora de exposição aos OE não foram observados terontes vivos na maioria das concentrações. Raros terontes vivos, com movimentação lenta, foram observados apenas nas duas primeiras horas das concentrações de 57 µl/L e 114 µl/L dos OEP. Nos animais controle não expostos e expostos ao DMSO, foram observados terontes e trofontes vivos, sem alteração de movimento ou danos celulares.

### 3.3. Efeito *in vivo* do OE de *M. alternifolia*

A sobrevivência (%) de peixes do grupo 1 ( $53,33 \pm 5,77$ ), que recebeu o tratamento com OE de *M. alternifolia* (50 µl/L), foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ), do que a dos peixes do grupo 2 ( $6,67 \pm 11,55$ ) e do grupo 3 ( $0 \pm 0$ ). A sobrevivência de apenas um peixe do grupo (2) exposto ao DMSO não foi suficiente para mostrar diferença do grupo (3) não exposto, onde todos os peixes morreram ( $p > 0,05$ ). Não foram observadas mortalidades no grupo (4) formado por peixes sadios.



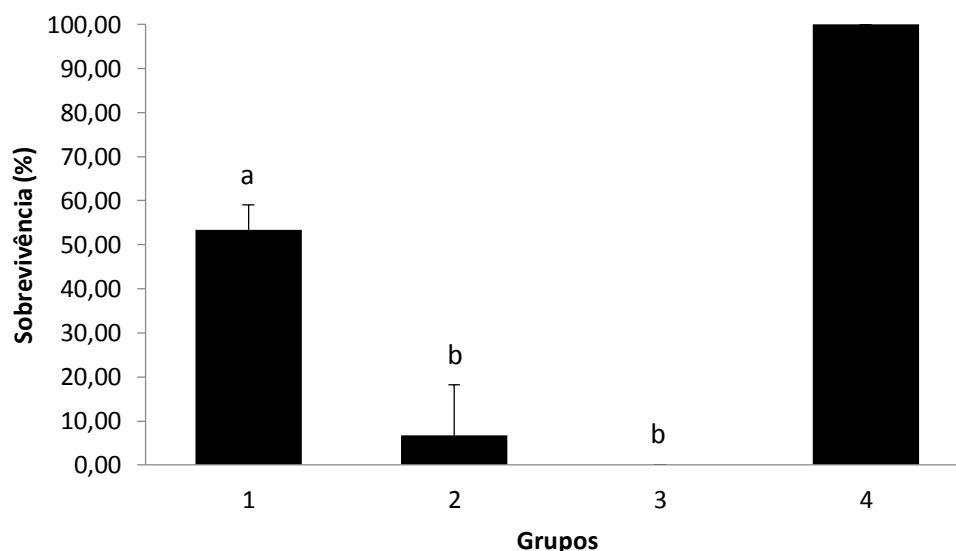


Figura 1. Sobrevivência (%) de peixes, durante teste *in vivo*, no tratamento da ictiofitiríase. Grupo 1 (peixes parasitados tratados com 50 µl/L *Melaleuca alternifolia*), grupo 2 (peixes parasitados expostos a 100 µl/L DMSO), grupo 3 (peixes parasitados) e grupo 4 (peixes sadios).

A análise parasitológica de 5 peixes antes do início do teste *in vivo* mostrou elevado grau de parasitismo (mais do que 200 trofontes em tegumento e brânquia) em peixes infestados experimentalmente. Para comparação da eficácia antiparasitária com o parasitismo pós-tratamento *in vivo*, foi considerada uma média inicial de 200 trofontes em cada um desses órgãos. Após o tratamento em banhos com OE de *M. alternifolia* (50 µl/L) a contagem média de trofontes de *I. multifiliis* foi de 0,4 no tegumento e 2,4 na brânquia (Tabela 5). O resultado deste tratamento representou 99,80% de eficácia contra *I. multifiliis* no tegumento e 98,80% de eficácia contra o parasito nas brânquias.

Tabela 5. Número de trofontes de *Ichthyophthirius multifiliis* encontrados em brânquia e tegumento de peixes infestados experimentalmente, antes e após o tratamento com o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

Peixe	Contagem de trofonte inicial		Contagem de trofonte pós-tratamento	
	Tegumento	Brânquia	Tegumento	Brânquia
1	> 200	> 200	2	7
2	> 200	> 200	0	0
3	> 200	> 200	0	0
4	> 200	> 200	0	0

5	> 200	> 200	0	5
Média	200	200	0,4	2,4

No término do teste *in vivo*, peixes do grupo sadio mostraram média de 169 trofontes em tegumento e 71,2 trofontes em brânquia caracterizando uma infestação natural, devido às condições ambientais favoráveis ao parasito *I. multifiliis* e desfavoráveis ao hospedeiro durante o período.

#### 3.4. Diagnóstico de infecção bacteriana secundária

Durante análise das colônias bacterianas foi observado predomínio de colônias grandes, redondas e alaranjadas com bordas escuras ou pretas, formadas por bastonetes curtos gram negativo, e cresceram em ambas temperaturas de incubação (25°C e 30°C) dos isolados do rim. No diagnóstico molecular foram identificadas duas bactérias patogênicas para peixes. Colônias incubadas à 25°C foram identificadas como *Edwardsiella tarda* (cepa ATCC 15947), enquanto as incubadas à 30°C foram identificadas como *Citrobacter freundii* (cepa DSM 30039).

A análise dos peixes recém mortos (dois peixes não tratados e dois peixes tratados) durante o teste *in vivo* revelaram a infecção secundária por esses dois patógenos oportunistas, o que ocorreu devido a grave ictiofitiríase. Não foram observadas lesões macroscópicas em órgãos internos desses peixes, sendo os sinais clínicos da bacteriose apenas externos. Não foram encontradas lesões externas, sinais clínicos ou comportamento anormal nos peixes sobreviventes do grupo tratado com *M. alternifolia*.

## 4. DISCUSSÃO

Pesquisas recentes tem avaliado o potencial de extratos de plantas (Militz et al. 2013), OE (Hussein et al. 2013) e compostos ativos isolados (Shan et al. 2014) no controle de doenças na aquicultura. Diversas plantas medicinais como *Allium sativum* (Buchmann et al. 2003), *Macleaya cordata* (Yao et al. 2010), *Macleaya microcarpa* (Yao et al. 2011), *Magnolia officinalis*, *Saphora alopecuroides* (Yi et al. 2012), *Capsicum frutescens* (Ling et al. 2012), *Psoralea corylifolia* (Ling et al. 2013) e *Toddalia asiatica* (Shan et al. 2014) mostraram atividade *in vitro* contra *I. multifiliis*, tendo potencial para uso no tratamento da ictiofitiríase. No entanto, a existência de diferentes produtos fitoterápicos e diferentes metodologias de estudo dificulta a comparação entre os antiparasitários.

No resultado do teste *in vitro*, os OE de *M. alternifolia*, *L. angustifolia* e *M. piperita* apresentaram efeito anti-trofonte de *I. multifiliis*. Todos os OE estudados apresentaram 100% de eficácia contra trofontes expostos durante quatro horas às concentrações de 227 µl/L e 455 µl/L, enquanto Ekanem et al. (2004) observaram 100% de eficácia contra trofontes após seis horas de exposição aos extratos de *Mucuna pruriens* (150 mg/L) e *Carica papaya* (200 mg/L). Ainda, na maior concentração (455 µl/L) os três OE apresentaram 100% de eficácia contra trofontes desde a primeira hora de observação, mostrando-se promissores para testes na forma de tratamentos rápidos da ictiofitiríase.

Durante contagem de trofontes foram observados sinais de inchaço, vacuolização e lise nos parasitos mortos quando expostos aos OEP. Em revisão de Bakkali et al. (2008), a despolarização e permeabilização de membranas, inchaço, vacuolização e vazamento de citoplasma, assim como alterações nucleares foram descritas como alguns dos efeitos tóxicos dos OEP contra células de patógenos eucariontes. Esses efeitos corroboram com a descrição de Zhang et al. (2013), quando a

pentagalloylglucose extraída da *Galla chinensis* causou aumento da permeabilidade da membrana plasmática de teronte e tomonte. Isto sugere que, o mecanismo de citotoxicidade dos OEP e outros fitoterápicos contra todas as fases do *I. multifiliis*, é similar ao descrito para outros patógenos. Neste estudo, a mortalidade de terontes em quase todos os grupos indica que esta fase é mais sensível do que os trofontes, o que foi descrito por Ling et al. (2012) e Yi et al. (2012). Por isso, testes devem preferencialmente garantir a mortalidade das outras fases de *I. multifiliis* que não a fase teronte.

O uso *in vivo* do OE de *M. alternifolia* (50 µl/L) foi eficaz no tratamento de peixes com ictiofitiríase, onde mais de 50% dos peixes sobreviveram e a eficácia parasiticida foi próxima de 100% no tegumento e brânquia. Considerando as condições totalmente desfavoráveis ao hospedeiro durante o estudo *in vivo* (temperatura média de 19 °C, alto parasitismo inicial e infecção secundária natural) os resultados obtidos são considerados promissores. A temperatura média de 19 °C é considerada um fator de risco para ocorrência de surtos de ictiofitiríase (Wei et al. 2013), além de não ser a temperatura ideal para peixes *P. mesopotamicus*, que preferem temperaturas de 23-28 °C (Martinez et al. 2006). O diagnóstico da ictiofitiríase de ocorrência natural no grupo (4) de peixes sadios confirma essas informações.

Em estudo *in vivo*, Zhang et al. (2013) observaram sobrevivência de 53,3% de “catfish” *Ictalurus punctatus* infestados por *I. multifiliis* tratados com 10 mg/L de pentagalloylglucose (composto ativo da *Galla chinensis*). Porém, os peixes “catfish” foram expostos a pentagalloylglucose uma vez ao dia por 10 dias, sendo diferente dos banhos diários de apenas 2 horas durante 5 dias realizados no teste *in vivo* deste estudo. Em relação à eficácia parasitária, Ekanem et al. (2004) concluíram que extratos de *M. pruriens* (200 mg/L) e *C. papaya* (250 mg/L) reduziram em 92% o número de *I.*

*multifiliis* em *Carassius auratus* tratados em banhos de 24 horas por 3 e 4 dias, respectivamente, sendo menos eficazes que o banho de 2 horas por 5 dias com OE *M. alternifolia* (50 µl/L) do presente estudo.

Os peixes mortos, de todos os grupos infestados experimentalmente, apresentaram perda de pigmentação e lesão ulcerativa na pele. O diagnóstico microbiológico de peixes recém-mortos (do grupo tratado e não tratado) durante o teste *in vivo* revelou a presença de dois patógenos oportunistas *C. freundii* e *E. tarda*. Sinais clínicos observados nos peixes deste estudo foram descritos em infecções por citrobacteriose (Türk et al. 2013) e edwardsiellose (Yamasaki et al. 2013).

Alguns trabalhos relatam maior susceptibilidade a bacterioses em peixes parasitados por *I. multifiliis* (Xu et al. 2012a,c), além disso Xu et al. (2012b) concluíram que este parasito pode ser um vetor da edwardsiellose causada por *Edwardsiella ictaluri*. Os resultados descritos no teste *in vivo* como sobrevivência e ausência de lesões externas, sinais clínicos ou comportamentos anormais em peixes sobreviventes, sugerem que o OE de *M. alternifolia* pode ter efeito contra as infecções oportunistas causadas por *C. freundii* e *E. tarda*. De fato, o terpineol, principal componente do OE de *M. alternifolia*, também é responsável por ampla atividade antibacteriana (Carson et al. 2006), além de parasiticida. Por isso, o uso de fitoterápicos contra essas duas bacterioses é promissor. Muniruzzaman e Chowdhury (2008) mostraram que 100% de *Pangasius hypophthalmus* infectados por *E. tarda* recuperaram da doença quando alimentados com 3% de decocção de folhas de *Calotropis gigantea* na ração, enquanto Albert e Ransangan (2013) concluíram que os extratos brutos de *Piper betle*, *Phyllanthus ninuri* e *Syzygium aromaticum* apresentam forte inibição de bactérias patogênicas gram negativas de peixes, entre elas *E. tarda*. Não foi encontrada descrição do uso de fitoterápicos contra *C. freundii* isolada de peixe, mas existem registros da

atividade antibacteriana de plantas medicinais contra esta bactéria isolada de humanos (Sharma et al. 2013; Souza et al. 2013). Infecções bacterianas secundárias são comuns em peixes parasitados, por isso estudos sobre atividade antibacteriana de OE em patógenos de peixes são encorajados. Particularmente, estudos sobre a atividade do OE de *M. alternifolia* contra infecções experimentais por *E. tarda* e *C. freundii* são necessários para confirmar seu efeito positivo no tratamento dessas bacterioses.

## 5. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* e *Mentha piperita* foram avaliados com potencial efeito parasiticida contra *Ichthyophthirius multifiliis*. O tratamento em banhos com o óleo essencial de *M. alternifolia* (50 µl/L) é capaz de tratar ictiofitiríase, inclusive em casos graves da doença.

## 6. AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (concessão número 2012/19414-7). Os autores agradecem ao grupo do Laboratório de Divisão Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP pela participação no projeto, à equipe do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (CAUNESP) pela realização dos testes *in vitro*, à equipe do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) pela ajuda no teste *in vivo*. Agradecimentos à Fernanda de A. Sebastião e José Dias Neto durante coleta e diagnóstico bacteriano.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abd El-Galil MA, Aboelhadid SM. (2012). Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. *Vet Parasitol* 185(2):57-63.
- Albert V, Ransangan J. (2013). Antibacterial potential of plant crude extracts against Gram negative fish bacterial pathogens. *Int J Res in Pharma Biosci* 3(2):21-27.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol* 46(2):446-475.
- Buchmann K, Jensen PB, Kruse KD. (2003). Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: in vitro experiments. *N A J Aquacult* 65(1):21-24.
- Buchmann K, Sigh J, Nielsen CV, Dalgaard M. (2001). Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet Parasitol* 100(1):105-116.
- Callander JT, James PJ. (2012). Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. *Vet Parasitol* 184:271-278.
- Carraschi SP, Barbuio R, Ikefuti CV, Florêncio T, da Cruz C, Ranzani-Paiva MJT. (2013). Effectiveness of therapeutical agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*, in press.
- Carson CF, Hammer KA, Riley TV. (2006). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 19:50–62.
- Carvalho CO, Chagas ACS, Cotinguiba F, Furlan M, Brito LG, Chaves FCM, Stephan MP, Bizzo HR, Amarante AFT. (2012). The anthelmintic effect of plant extracts on

- Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Vet Parasitol* 183:260–268.
- Cavanagh HMA, Wilkinson JM. (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res* 16:301–308.
- Ekanem AP, Obiekezie A, Kloas W, Knopf K. (2004). Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitol Res* 92:361–366.
- Farmer BD, Fuller SA, Mitchell AJ, Straus DL, Bullard SA. (2013). Efficacy of Bath Treatments of Formalin and Copper Sulfate on Cultured White Bass, *Morone chrysops*, Concurrently Infected by *Onchocleidus mimus* and *Ichthyophthirius multifiliis*. *J World Aquacult Soc* 44(2):305-310.
- Hussein MMAH, Hassan WH, Moussa IMI. (2013). Potential use of allicin (garlic, *Allium sativum* Linn, essential oil) against fish pathogenic bacteria and its safety for monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Food Agric Environ* 11(1):696-699.
- Ling F, Lu C, Tu X, Yi Y, Huang A, Zhang Q, Wang G. (2013). Antiprotozoal screening of traditional medicinal plants: evaluation of crude extract of *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish. *Parasitol Res* 112(6):2331-2340.
- Ling F, Wang JG, Liu QF, Li M, Ye LT, Gong XN. (2010). Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in goldfish (*Carassius auratus*) by potassium ferrate (VI) treatment. *Vet Parasitol* 168(3):212-216.



- Ling F, Wang JG, Lu C, Wang GX, Lui YH, Gong XN. (2012). Effects of aqueous extract of *Capsicum frutescens* (Solanaceae) against the fish ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitol Res 111(2):841-848.
- Martinez C.B.R., Azevedo F, Winkaler EU. (2006). Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: Cyrino JEP, Urbinati EC. Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, pp 81–95. Em português.
- Matthews RA. (2005). *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and Ichthyophthiriosis in Freshwater Teleosts. Adv Parasit 59:159-241.
- Mikus J, Harkenthal M, Steverding D, Reichling J. (2000). In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. Planta Med 66:366–368.
- Militz TA, Southgate PC, Carton AG, Hutson KS. (2013). Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. J Fish Dis, in press.
- Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HMA. (2006). Essential oils from Australian grown *Lavandula* spp.: a comparison of antibacterial activity. Int J Aromath 16(1):9–14.
- Muniruzzaman M, Chowdhury MBR. (2008). Evaluation of medicinal plants through fish feed against bacterial fish disease. Prog Agric 19(2):151-159.
- Osman HAM, El-Bana LF, Noor El Deen AE, Abd El-Hady OK. (2009). Investigations on white spots disease (Ichthyophthiriasis) in catfish (*Clarias gariepinus*) with special reference to the immune response. Global Vet 3(2):113–119.

- Oumzil H, Ghouлами S, Rhajaoui M, Ilidrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M, Benjouad A. (2002). Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother Res* 16:727–731.
- Pilarski F, Rossini AJ, Ceccarelli PS. (2008). Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Braz J Biol* 68:631-637.
- Rico A, Van den Brink PJ. (2014). Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. *Sci Total Environ* 468:630-641.
- Rintamäki-Kinnunen P, Rahkonen M, Mannermaa-Keränen AL, Suomalainen LR, Mykrä H, Valtonen ET. (2005). Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. *Dis Aquat Organ* 64:69-76.
- Sapkota A, Sapkota AR, Kucharski M, Burke J, McKenzie S, Walker P, Lawrence R. (2008). Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environ Int* 34(8):1215-1226.
- SAS Institute. SAS/STAT 9.2. User's guide. SAS Institute Inc, Cary, NC, 2008
- Shan XF, Kang YH, Bian Y, Gao YH, Wang WL, Qian AD. (2013). Isolation of active compounds from methanol extracts of *Toddalia asiatica* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). *Vet Parasitol* 199(3-4):250-254.
- Sharma U, Agnihotri RK, Ahmad S, Mahajan S, Sharma R. (2013). Antibacterial activity of some medicinal plants of family Lamiaceae from Braj region. *Glob J Med Plant Res* 1(1):72-76.

- Sheu DS, Wang YT, Lee CY. (2000). Rapid detection of polyhydroxyalkanoate accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiol* 146:2019-2025.
- Souza NC, Gomes MN, Maciel RR, Silva RJ, Trescher TF, Gorza FD, Pedro GC, Correa KCS, Souza MCR, Silva JR. (2013). Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Stryphnodendron barbatiman* against *Citrobacter freundii*. *Mat Sci Appl* 4(12):780-785.
- Srivastava S, Sinha R, Roy D. (2004). Toxicological effects of malachite green. *Aquat Toxicol* 66:319–329.
- Steverding D, Morgan E, Tkaczynski P, Walder F, Tinsley R. (2005). Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp. infection of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Dis Aquat Organ* 66:29–32.
- Thomsen PS, Jensen TM, Hammer KA, Carson CF, Mølgaard P, Riley TV. (2011). Survey of the Antimicrobial Activity of Commercially Available Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oil Products In Vitro. *J Altern Complem Med* 17(9):835–841.
- Türk N, Yabancı M, Baba E, Ontaş C, Aydın MA. (2013). Detection of bacterial diseases and determination of antibacterial susceptibilities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) in Turkey. *J Fish Sci* 7(4):351-359.
- Vidal F, Vidal JC, Gadelha APR, Lopes CS, Coelho MGP, Monteiro-Leal LH. (2007). *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Exp Parasitol* 115:25–31.

- Viollon C, Mandin D, Chaumont JP. (1996). Activite´s antagonistes, in vitro, de quelques huiles essentielles et de compose´s naturels volatils vis a´ vis de la croissance de *Trichomonas vaginalis*. *Fitoterapia* 67:279–281.
- Wei JZ, Li H, Yu H. (2013). Ichthyophthiriasis: emphases on the epizootiology. *Lett Appl Microbiol* 57(2):91-101.
- Xu DH, Klesius PH, Shoemaker CA. (2007). Evaluation of a cohabitation challenge model in immunization trials for channel catfish *Ictalurus punctatus* against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Dis Aquatic Organ* 74(1):49-55.
- Xu DH, Pridgeon JW, Klesius PH, Shoemaker CA. (2012a) Parasitism by protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* enhanced invasion of *Aeromonas hydrophila* in tissues of channel catfish. *Vet Parasitol* 184:101–107.
- Xu DH, Shoemaker CA, Klesius PH. (2012b) *Ichthyophthirius multifiliis* as a potential vector of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *FEMS Microbiol Lett* 329:160–167.
- Xu DH, Shoemaker CA, Martins ML, Pridgeon JW, Klesius PH. (2012c) Enhanced susceptibility of channel catfish to the bacterium *Edwardsiella ictaluri* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet Microbiol* 158:216–219.
- Yamasaki M, Araki K, Nakanishi T, Nakayasu C, Yoshiura Y, Iida T, Yamamoto A. (2013). Adaptive immune response to *Edwardsiella tarda* infection in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Vet Immunol Immunop* 153(1-2):83-90.
- Yao JY, Shen JY, Li XL, Xu Y, Hao GJ, Pan XY, Wang GX, Yin WL. (2010). Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius*

*multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Parasitol Res 107(5):1035-1042.

Yao JY, Zhou ZM, Li XL, Yin WL, Ru HS, Pan XY, Hao GJ, Shen JY. (2011). Antiparasitic efficacy of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine from *Macleaya microcarpa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in richadsin (*Squaliobarbus curriculus*). Vet Parasitol 183(1):8-13.

Yi YL, Lu C, Hu XG, Ling F, Wang GX. (2012). Antiprotozoal activity of medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol Res 111(4):1771-1778.

Zhang Q, Xu DH, Klesius PH. (2013). Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Vet Parasitol 198(1):45-53.

**CAPÍTULO 3**  
**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando surtos de mortalidades ocorrem, a utilização de drogas e quimioterápicos é frequentemente a maneira mais efetiva de controlar a enfermidade e reduzir a oportunidade de transmissão de patógenos para todo o plantel. Todavia, a utilização dessas substâncias na piscicultura pode contaminar o ambiente, contribuir para o aparecimento de microorganismos resistentes (ambos, patógeno e ambiente) e provocar impactos adversos em espécies não-alvo, colocando em risco toda a cadeia trófica. Além disso, muitas vezes os peixes não suportam os tratamentos por estarem muito parasitados, em níveis elevados de estresse, ou com alterações severas no epitélio branquial.

No presente trabalho foi descrito o panorama sobre a problemática dos tratamentos de doenças de peixes e a frequente busca por produtos que controlem os patógenos com maior segurança para o ambiente aquático e para os humanos. A fim de fomentar futuras pesquisas na área, foi realizada extensa revisão sobre os principais fitoterápicos, e os melhores resultados obtidos no tratamento de enfermidades de peixe.

Os ensaios *in vitro* são a melhor alternativa para ensaios de eficácia quando se pretende definir um composto no meio de inúmeras alternativas, sendo então, inviável o teste *in vivo* de todos os fitoterápicos em peixe. O teste de eficácia *in vivo* deve sempre ser considerado para que o potencial do fitoterápico como antimicrobiano seja confirmado *in situ* contra o patógeno.

Neste contexto, considera-se a utilização de fitoterápicos no tratamento de doenças de peixes como estratégia terapêutica alternativa aos produtos atualmente empregados. Os três óleos essenciais de plantas estudados apresentaram resposta positiva contra o parasito *I. multifiliis*, sendo que o óleo essencial de *M. alternifolia* foi eficaz no tratamento da ictiofitiríase.

Para o melhor entendimento do efeito dos fitoterápicos na saúde dos peixes e na eficácia contra doenças, recomenda-se que estudos adicionais sejam realizados com toxicologia de fitoterápicos em peixes, com outras formas de tratamento, incorporação à ração, além de testes com organismos não alvos para traçar o perfil de alguns fitoterápicos com potencial uso na piscicultura.